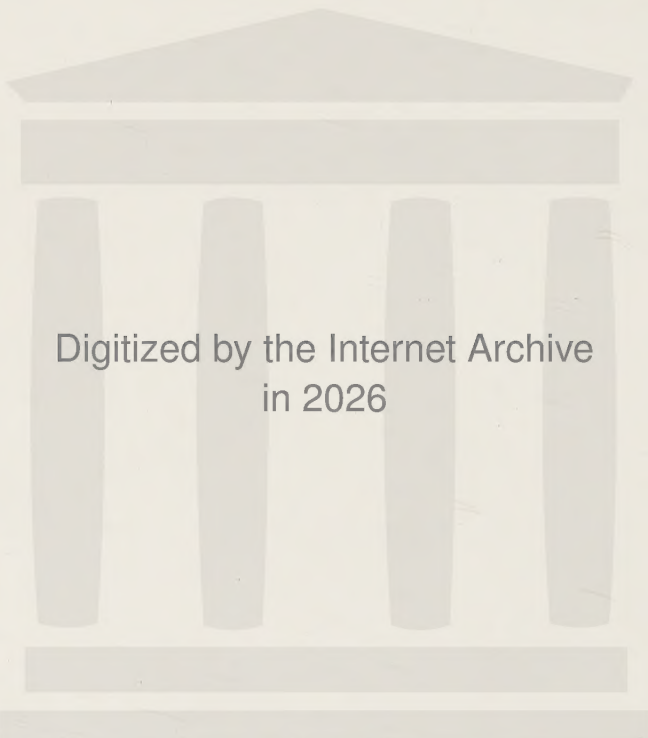


ANALYSE DER ERSTEN REKONSTITUTIONSSTUFE DER KLEINEN RIBOSOMALEN UNTEREINHEIT VON ESCHERICHIA COLI

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Biologie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Otfried Marquardt
aus Vikhammer in Norwegen

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ANALYSE DER ERSTEN REKONSTITUTIONSSTUFE DER KLEINEN RIBOSOMALEN UNTEREINHEIT VON ESCHERICHIA COLI

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde des
Fachbereichs Biologie der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Otfried Marquardt
aus Vikhammer in Norwegen

1. Gutachter: Prof. H. G. Wittmann

2. Gutachter: Prof. E. R. Lochmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.5.1976



Inhaltsverzeichnis:

	Seite
Danksagung	1
Zusammenfassung	2
Alphabetisches Verzeichnis der im Text wiederholt gebrauchten Abkürzungen	4
1. Einleitung	5
2. Material und Methoden	9
2.1. Chemikalien	9
2.2. Puffer, Färbelösungen und Sucrosen .	9
2.3. Gele	10
2.4. Präparation von 3oS Untereinheiten .	11
2.5. Präparation von 3,0c-Partikeln aus 3oS Untereinheiten	11
2.6. Essigsäureextraktion von Proteinen .	12
2.7. Säulentrennung der Proteine	13
2.8. Gel-Elektrophoresen	14
2.8.1. 1-D Elektrophorese mit Tris-Gelen	14
2.8.2. 1-D Elektrophorese mit SDS-Gelen	15
2.8.3. 2-D Elektrophorese	15
2.9. Phenolextraktion von RNA	17
2.10. Bildung von funktionell aktiven 3oS Untereinheiten	17
2.10.1. Bildung in einem Schritt ...	17
2.10.2. Bildung in zwei Schritten ..	18
2.11. Die Poly (U) abhängige Poly (Phe) Synthese	19
2.12. Spinco SW4o Zentrifugation	20
3. Resultate	22
3.1. Analyse zweier Konformationen des 3,0c-Partikels	22

	Seite
3.1.1. Die funktionelle Übereinstimmung der Konformation 3MIII des 3,0c-Partikels mit dem RI ₃₀ [*] -Partikel	22
3.1.2. Die Überführung ribosomaler Partikel in einen reversibel inaktiven Zustand durch Inkubation mit LiCl	25
3.2. Analyse des Verhaltens von 16S RNA bei SW40 Zentrifugation und Vergleich mit dem Verhalten von 3,0c-Partikeln .	25
3.3. Aktivität und Proteingehalt von 3,0c-Partikeln	26
3.4. Studien zur Fähigkeit der 3,0c-Proteine, an 16S RNA zu binden	32
3.5. Der Einfluß des Ionenmilieus auf die Spezifität der Bindung von 3,0c-Proteinen an 16S RNA	38
3.6. Der Einfluß einzelner 3,0c-Proteine auf die Bildung der Konformation 3MIII	40
3.7. Der Einfluß des Poly (Phe) Synthesystems auf den Rekonstitutionsprozeß	45
3.7.1. Optimierung der Ionenkonzentration des Poly (Phe) Systems für den zweiten Rekonstitutionsschritt (3,0c-Partikel → 3oS) ..	48
3.7.2. Der Einfluß der während der Poly (Phe) Synthese herrschenden Inkubationstemperatur auf die Rekonstitution	49
3.8. Die Identifizierung derjenigen in der 3,0c-Proteinfraktion enthaltenen Proteine, die für die temperaturabhängige Konformationsänderung RI ₃₀ → RI ₃₀ [*] notwendig sind	53

	Seite
3.9. Weitere Experimente mit dem rekonstituierten Minimal-core-Partikel aus den vier Proteinen S4, S7, S8 und S15 sowie 16S RNA	60
3.10. Eine Methode, durch die auf einfache Weise eine große Anzahl gleichartiger Sucrosegradienten gleichzeitig hergestellt werden kann: Der kryo-genetische Gradient	63
4. Diskussion	75
4.1. Die Funktionsäquivalenz der 3,0c-Proteine mit den RI_{30}^* -Partikeln ...	75
4.2. Die biologische Bedeutung der Hierarchie der Proteinanlagerung während der Bildung von RI_{30}^* -Partikeln	85
4.3. Anhang	90
Literaturverzeichnis	92
Lebenslauf	97

Danksagung

Für die stete Bereitschaft, diese Arbeit durch Rat-schläge und Ermutigungen zu fördern, bin ich Herrn Dr. K.H. Nierhaus zu großem Dank verpflichtet. Herrn Professor Dr. H.-G. Wittmann danke ich für die ge-reinigten ribosomalen Proteine, die in dieser Arbeit benutzt wurden.

Zusammenfassung:

1. Werden 30S Untereinheiten mit 3M LiCl inkubiert, entsteht eine Partikel (3,0c), welche neben 16S RNA neun Proteine enthält. Bis auf SI6 und SI9 sind alle Proteine als "Bindungsproteine" bekannt, das heißt, es sind Proteine, die ohne die Hilfe anderer Proteine direkt an 16S RNA binden können. Mittels zweier Techniken (Zentrifugation und Elektrophorese) gelang der Nachweis, daß auch SI6 und SI9 direkt an 16S RNA binden können, und zwar sowohl bei 0°C als auch bei 40°C. Mit der Elektrophoresetechnik konnte zusätzlich gezeigt werden, daß bei Konzentrationen von 150 mM NH_4^+ und 4 mM Mg^{++} eine Interaktion der Proteine nur mit 16S RNA, nicht jedoch mit 23S RNA auftritt. Diese Bedingung ist daher optimal für die Messung spezifischer 16S RNA-Protein-Wechselwirkungen.
2. Bei der Rekonstitution von 30S Untereinheiten entsteht ein Zwischenprodukt RI_{30}^* , dessen Bildung temperaturabhängig ist. Dieses kann in der Kälte die noch fehlenden Proteine anlagern, so daß aktive 30S Untereinheiten entstehen. Zur Analyse der für die Bildung des RI_{30}^* Partikels notwendigen ribosomalen Komponenten wurde zunächst eine Methode entwickelt, die mit hoher Empfindlichkeit die Bildung dieses Zwischenprodukts zu messen gestattet. Die Methode besteht darin, daß in einem ersten Schritt das RI_{30}^* Partikel gebildet wird, während in einem zweiten Schritt das Zwischenprodukt sich zu einer aktiven 30S Untereinheit vervollständigen kann. Der zweite Schritt erlaubt keine Neubildung des RI_{30}^* Partikels. Mit diesem System gelang es, unter Verwendung von teilweise selbst gereinigten Proteinen die für die Bildung des Zwischenprodukts notwendigen ribosomalen Komponenten zu identifizieren. Neben 16S RNA waren

die Proteine S8 und SI5 essentiell notwendig, während die Proteine S4 und S7 alternativ notwendig waren. Alle fünf Komponenten zusammen bilden die RI₃₀* Partikel.

3. Schließlich wird in dieser Arbeit eine einfache, neue Technik zur Herstellung von Sucrosegradienten optimiert und mit Anwendungsbeispielen charakterisiert.

Alphabetisches Verzeichnis der im Text wiederholt
gebrauchten Abkürzungen:

1-D Elektrophorese	= eindimensionale Acrylamid-Gelelektrophorese
2-D Elektrophorese	= zweidimensionale Acrylamid-Gelelektrophorese
3,oc-Partikel	= aus 3oS Untereinheiten durch Einwirkung von 3 M LiCl entstandene Partikel
3,oc-Proteine	= im 3,oc-Partikel enthaltene Proteine
BPB	= Bromphenolblau
CBB	= Coomassie Brilliant-Blue
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
HAc-Proteine	= Proteine, die aus RNA-haltigen Partikeln mit Essigsäure extrahiert wurden
Poly(Phe)Synthese	= Polyphenylalanin-Synthese
Poly(U)	= Polyuridylsäure
RI ₃₀ Partikel	= Zwischenprodukt bei der Bildung von 3oS Untereinheiten
RI ₃₀ * Partikel	= temperaturaktiviertes RI ₃₀ Partikel
RNA	= Ribonukleinsäure
SDS	= Natriumdodecylsulfat
SP3,o-Proteine	= den 3,oc-Proteinen komplementäre 3oS Proteinfraction
TP3o	= Proteine der 3oS Untereinheit

1. Einleitung

Träger der gesamten genetischen Information der Zelle ist die DNA. Zur Umsetzung dieser Information wird die DNA in ein neues Molekül umgeschrieben, nämlich in die messenger RNA (mRNA) oder Boten-RNA. Die Information der Boten-RNA wird mittels bestimmter Zellorganellen, den Ribosomen, in die Aminosäuresequenz der Proteine übersetzt.

Drei Nukleotide (das ist ein Codon) der Boten-RNA codieren dabei für eine Aminosäure im Protein. Das Codon tritt jedoch nicht in direkte Wechselwirkung mit der Aminosäure. Vielmehr dient als Bindeglied die Transfer RNA (tRNA). Sie hat an einem Ende ein Anticodon (ein zum Codon komplementäres Triplet), das mit der Boten-RNA interagiert. Am gegenüberliegenden Ende trägt sie die Aminosäure.

Die Beteiligung der Ribosomen an der Expression genetischer Information ist mittelbar. Sie sind der Ort, an dem Boten-RNA und mit Aminosäure beladene tRNA aufeinandertreffen.

Fast alle Kenntnisse über Struktur und Funktion von Ribosomen sind an Ribosomen aus *Escherichia coli* gewonnen worden. Deshalb beziehen sich die folgenden Ausführungen auf *Escherichia coli* Ribosomen: Bei Senkung der Mg^{++} Konzentration zerfallen Ribosomen in ihre Untereinheiten. Die chemische Analyse der kleinen ribosomalen Untereinheit (30S) zeigt, daß in ihr ein Molekül 16S RNA (Stanley & Bock, 1965) und 21 verschiedene Proteine (Kaltschmidt & Wittmann, 1970 a) vorkommen. Aus diesen Strukturelementen lassen sich in vitro Partikel zusammensetzen, die die gleichen Funktionen ausüben können und das gleiche Sedimentationsverhalten haben wie native 30S Untereinheiten (Traub & Nomura, 1968). Daraus kann ge-

geschlossen werden, daß neben den isolierten Strukturelementen keine weiteren Substanzen für den Aufbau und die Funktion der 30S Untereinheit von Bedeutung sind.

Die großen ribosomalen Untereinheiten (50S) bestehen aus je zwei Molekülen RNA, 23S (Kurland, 1960) und 5S (Rasset & Monier, 1963) sowie je 34 Proteinen (Kaltschmidt & Wittmann, 1970). Auch hier ist eine in vitro Rekonstitution aus den genannten Strukturelementen möglich (Nierhaus & Dohme, 1974).

Ribosomen müssen mannigfache Aufgaben erfüllen, und es ist daher gerechtfertigt, in ihnen Multienzymkomplexe zu sehen. Durch das Studium der Bildung der Ribosomen erhoffte man sich zu Recht Einblick in die Verteilung der verschiedenen Funktionen auf die einzelnen Komponenten.

Über die in vivo Synthese von 30S Untereinheiten wurden bisher folgende Erkenntnisse gesammelt: Noch während der ribosomale RNA Strang (von 5' nach 3') synthetisiert wird, lagern sich die ribosomalen Proteine an. Zwangsläufig ist es den Proteinen, die an die 5'Hälfte der 16S RNA binden, eher möglich sich anzulagern als anderen Proteinen.

Die nun synthetisierte RNA ist länger als die 16S RNA in 30S Untereinheiten. Sie wird im Reifungsprozeß enzymatisch verkürzt. Auch hinsichtlich des Proteinbesatzes wird ein Reifungsprozeß festgestellt. Es kann ein 30S Vorläufer (Precursor) isoliert werden, der mit 21S sedimentiert und einen reduzierten Proteinbesatz aufweist (Nashimoto et al., 1971; Nierhaus et al., 1973). Solche 21S Partikel werden in einer kältesensitiven Mutante von *Escherichia coli* angereichert, wenn diese in ein Medium mit niedriger Temperatur überführt wird. Das läßt darauf schließen, daß die Bildung von 30S Untereinheiten in vivo temperaturabhängig ist.

Die in vivo Bildung von 50S Untereinheiten verläuft ähnlich. Allerdings werden hier zwei Vorstufen gefunden.

Bei den Versuchen zur in vitro Rekonstitution von 30S Untereinheiten (Traub & Nomura, 1968) werden die Strukturelemente reifer Untereinheiten benutzt, so daß der Reifungsprozeß nicht untersucht werden kann. Unter diesen Voraussetzungen findet die Bildung von selbst statt (self assembly). Sie ist unabhängig von außerribosomalen Enzymaktivitäten. Das ist bei der großen Zahl von beteiligten Bauelementen überraschend. Dieser Vorgang ist beispielhaft für die Selbstregulation des Aufbaus eines Multienzymkomplexes. Diese Bedeutung der in vitro Rekonstitution von 30S Untereinheiten rechtfertigt daher eine eingehendere Untersuchung.

Es konnte gezeigt werden (Traub & Nomura, 1969; Held & Nomura, 1973), daß sich die in vitro Rekonstitution von 30S Untereinheiten in zwei Stufen vollzieht. Zunächst gruppieren sich bei 0°C einige ribosomale Proteine um die 16S RNA zu einem Zwischenprodukt, dem RI₃₀ Partikel (engl.: Reconstitution Intermediate). Die hier vorhandenen Proteine sind Voraussetzung für die Anlagerung der restlichen Proteine im zweiten, temperaturabhängigen Schritt. Es reicht aus, das RI₃₀ Partikel bei 40°C zu inkubieren, damit sich anschließend die restlichen Proteine - auch in der Kälte - anlagern können. Die Wirkung der Inkubation wird so verstanden, daß die unzureichende Konformation des RI₃₀ Partikels in die notwendige Konformation (RI₃₀^{*}) überführt wird.

Bei dieser Ordnung der Bildung darf nicht übersehen werden, daß sich zwei Probleme überlagern (Held & Nomura, 1973): Einerseits existiert eine Hierarchie der Proteinanlagerung in dem Sinne, daß

einige Proteine nur dann assoziiert werden können, wenn bestimmte andere sich bereits angelagert haben. Andererseits muß eine Temperaturaktivierung erfolgen, bevor alle Proteine angelagert werden können. Nicht notwendigerweise sind die Proteine, die bei der Bildung der 30S Untereinheiten eine hervorragende Rolle spielen, identisch mit denen, die in Abhängigkeit von der Temperatur die aktive Konformation verursachen.

Die Vorgänge der in vitro Rekonstitution können hervorragend an einem Partikel studiert werden, mit dem sich unsere Arbeitsgruppe schon seit längerer Zeit beschäftigt (Schreiner & Nierhaus, 1973; Marquardt, 1973). Es handelt sich um Partikel, die aus 30S Untereinheiten durch Einwirkung von 3M LiCl (5 Std/0°C) entstehen. Wir nennen sie 3,0c-Partikel. Sie bestehen aus 16S RNA und 11 Proteinen. Die Schwingbecherzentrifugation zeigt mehrere Konformationen. Die Ausbildung dieser Konformationen ist temperaturabhängig. Während bei 0°C die schwerste Konformation dominiert, wird durch Inkubation bei 40°C für 15 Min die Bildung einer leichteren favorisiert. Sie ist die biologisch relevante Konformation, denn nur in dieser Form sind die Partikel in der Lage, sich bei 0°C mit den fehlenden Proteinen zu funktionell aktiven 30S Untereinheiten zu formieren. Die in der vorliegenden Arbeit behandelte Aufgabe bestand darin, diejenigen Proteine des 3,0c-Partikels herauszufinden, die notwendig für die Ausformung der biologisch relevanten Konformation sind.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Coomassie Brilliant-Blue (CBB) R-250, Desoxyribonuclease (EC 3.1.4.5.), Albumin aus Rinderserum (92% Lyophilisat), Bentonite - SF und Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden von der Firma Serva aus Heidelberg, Pyruvatkinase (15744), lösliche RNA von Escherichia coli (15518 RRAE) und Polyuridylsäure (15129 RPAB) wurden von der Firma Boehringer aus Mannheim bezogen. Außerdem wurden benutzt: [¹⁴C] Phenylalanin (CF 70) von Amersham; Selecta Filter Nr.6, 23 mm Durchmesser von Schleicher & Schüll; Insta - Gel (6003059) von Packard; kristalline Sucrose (ultrapure 909530) von Schwarz/Mann aus Orangeburg/USA; Sephadex G100-Gel von Pharmacia Fine Chemicals aus Uppsala/Schweden; TEMED und Mercaptoäthanol von Fluka AG aus Buchs/Schweiz. Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Merck aus Darmstadt gekauft.

2.2. Puffer, Färbe- und Sucroselösungen

PO₄-Puffer: 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,6, 1 mM MgCl₂, 6 mM Mercaptoäthanol; TMNSH-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 60 mM NH₄Cl, 6 mM Mercaptoäthanol; Tris-Puffer: 40 mM Tris-HCl, pH 7,6; TM-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgAc-EDTA; Li-TM-Puffer: 4 M LiCl, sonst wie TM-Puffer; TM4-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,8 4 mM MgAc, 0,2 mM EDTA; TM4-Harnstoff-Puffer: 6 M Harnstoff, sonst wie TM4-Puffer; TM1-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,8 1 mM MgAc, 0,2 mM EDTA; Rek-Puffer: 350 mM NH₄Cl, 20 mM MgAc, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 6 mM Mercaptoäthanol; 1 x TEB-SDS-Puffer: 90 mM Tris-H₃BO₄, pH 8,3 2,5 mM Na₂EDTA, 0,2% SDS; 1 D-Puffer: 1,45% Tris, 0,96%

H_3BO_4 , 36% Harnstoff, 0,24% EDTA, pH 8,6; 2 D-Puffer: 1,4% Glycin, 0,15% Essigsäure, pH 4,6; Phenol-SSC-EDTA: 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, 10 mM EDTA, pH 7,0, gesättigt mit Phenol.

RNA-Färbung: a) 0,1% Toluidinblau und 0,1% Essigsäure in Deionisat; b) 0,1% Toluidinblau und 30% Methanol in Deionisat; Proteinfärbung: a) 0,1% Amidoschwarz und 0,1% Essigsäure in Deionisat; b) 0,2% CBB und 4,5% Essigsäure in Deionisat.

BPB-Sucrose: 0,1% Brom-Phenol-Blau und 30% Sucrose in 1 x TEB; Rek-Sucrose: Sucrose unterschiedlicher Konzentration in Rek-Puffer; NTM1-Sucrose: Sucrose unterschiedlicher Konzentration, 350 mM NH_4Cl , 10 mM Tris-HCl, pH 7,8 1 mM MgAc, 0,2 mM EDTA.

2.3 Gele

50 ml 3,1% Tris-Gel enthalten: 1,5 g Sucrose, 1,55 g Acrylamid von Eastman Kodak, 90 mg Bisacrylamid, 2 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,6 0,025 ml TEMED, 1 ml 1,6% $(NH_4)_2S_2O_8$ und doppelt destilliertes Wasser.

50 ml 10% SDS-Gel enthalten: 1,5 g Sucrose, 5 g Acrylamid von Eastman Kodak, 90 mg Bisacrylamid, 100 mg SDS, 5 ml 10 x TEB, 0,025 ml TEMED, 1 ml 1,6% $(NH_4)_2S_2O_8$ und doppelt destilliertes Wasser. 10 ml

5% 1-D Gel enthalten: 0,5 g Acrylamid, 19 mg Bisacrylamid, 3,6 g Harnstoff, 0,49 g Tris, 0,32 g H_3BO_4 , 80 mg Na-EDTA, 0,019 ml TEMED und 0,1 ml 7% $(NH_4)_2S_2O_8$.

10 ml 10% 1-D Gel enthalten: 1 g Acrylamid, sonst wie oben. 10 ml 18% 2-D Gel enthalten: 1,8 g Acrylamid, 0,058 ml TEMED, 0,335 ml 7% $(NH_4)_2S_2O_8$, sonst wie oben. 10 ml 25% 2-D Gel enthalten: 2,5 g Acrylamid, sonst wie oben. 10 ml Probengel enthalten außer den allen Gelen gemeinsamen Reagentien 0,1 ml 50% Riboflavin-0,08% $(NH_4)_2S_2O_8$.

2.4. Präparation von 30S Untereinheiten (nach Schreiner & Nierhaus, 1973)

100g *Escherichia coli* KI2-Zellen vom Stamm AI9 (Gesteland, 1966) werden mit 300 ml PO_4 -Puffer gewaschen, der 0,001 mg DNase pro ml enthält, und mit Aluminiumoxyd-Pulver gemahlen. Nach Zugabe von PO_4 -Puffer wird der Rohextrakt zweimal zentrifugiert (je 40 Min/30 000 g). Daraus werden die Ribosomen durch Zentrifugation (3 Std/176 000 g) gewonnen und in PO_4 -Puffer resuspendiert (400 bis 700 A_{260} pro ml) und gründlich gegen den gleichen Puffer dialysiert. Etwa 7000 A_{260} werden einer Zonal-Zentrifugation (im Ti B XV-Rotor) unterworfen, wobei die Untereinheiten voneinander getrennt werden. Fraktionen, die 30S Ribosomen enthalten, werden gesammelt und durch Zugabe von 10% PEG 6000 sowie 1/100 Volumen 1 M MgAcetat gefällt (Expert-Bezançon et al., 1974). Das Sediment wird resuspendiert in TMNSH-Puffer. Die Aktivität, die abhängig ist vom Grad der Verunreinigung durch 50S Ribosomen, wird mit dem Poly (U) abhängigen Poly (Phe) System (Nierhaus et al., 1973) festgestellt. Mit der 2-D Elektrophorese (Kaltschmidt & Wittmann, 1970) wird nachgewiesen, ob alle 30S-Proteine vorhanden sind und ob die Verunreinigung der Aufarbeitung mit 50S Ribosomen so groß ist, daß auch Proteine dieser Untereinheit sichtbar werden.

2.5. Präparation von 3,0c-Partikeln aus 30S Ribosomen (nach Nierhaus & Montejó, 1973)

30S Ribosomen verlieren bei ansteigender LiCl-Konzentration nach und nach die nicht bindenden Proteine, während die bindenden an der RNA verbleiben (Homann & Nierhaus, 1971; Schreiner & Nierhaus, 1973).

Je 5000 A_{260} 30S Ribosomen wurden 10 Min bei 37°C inkubiert und anschließend mit Li-TM-Puffer gemischt, so daß bei einer Endkonzentration von 3 M LiCl 1 ml zwischen 15 und 20 A_{260} 30S Ribosomen enthielt. Nach einer Inkubation für 5 Std bei 0°C trennte anschließende Zentrifugation (5 Std/176000 g) oder Fällung mit 0,7 Vol. -20°C Äthanol (3 Std/ -20°C) die entstandenen 3,0c-Partikel von den SP 3,0-Proteinen. Der Niederschlag der Äthanol-fällung beziehungsweise das Sediment der Zentrifugation mit den 3,0c-Partikeln wurde in möglichst kleinem Volumen TM4-Puffer resuspendiert und gründlich gegen den gleichen Puffer dialysiert.

Beide Methoden lieferten, gemessen in A_{260} Einheiten, eine Ausbeute von etwa 80% an 3,0c-Partikeln bezogen auf eingegebene 30S Ribosomen. Die Identifizierung der Proteine, die in den 3,0c-Partikeln enthalten sind, erfolgte durch die 2-D Elektrophorese. Sucrosegradienten-Zentrifugation im SW40-Rotor sollte erweisen, ob ein homogenes Partikel oder ein Partikelgemisch entstanden war.

2.6. Essigsäureextraktion von Proteinen

Etwa 4000 A_{260} 30S Ribosomen beziehungsweise 3,0c-Partikel wurden 45 Min bei 0°C in 66% Essigsäure und 0,1 M Mg^{++} (Hardy et al., 1969) gerührt und anschließend zentrifugiert (30 Min/30 000 g). Dabei sammelten sich die Proteine im Überstand. Aus diesem wurden sie gefällt: Bei einer Konzentration von monovalenten Ionen kleiner als 500 mM mit 5 Vol. -20°C Aceton, sonst mit 4,5 Volumen -20°C Aceton und 1 Vol. -20°C Äthanol (jeweils in Gegenwart von 1/1000 Vol. 1 M Magnesiumacetat). Das durch anschließende Zentrifugation gebildete Sediment (30 Min/30 000 g) mußte im Exsikkator getrocknet

werden (2 Std/0°C), ehe die Proteine wieder in Lösung gebracht werden konnten. Je nach Verwendungszweck wurde in verschiedenen Puffern gelöst: Die aus 30S Untereinheiten isolierten Proteine (TP30) in TM4-Puffer, die 3,0c-Proteine in TM4-Harnstoff-Puffer. Letztere wurden nach der Dialyse gegen den gleichen Puffer (3 x 45 Min) mittels einer Sephadex G100 Säule voneinander getrennt.

2.7. Säulentrennung der Proteine

Die elf in 3,0c-Partikeln vorkommenden Proteine unterscheiden sich alle im Molekulargewicht (Voynow & Kurland, 1971). Das Molekulargewicht des Proteins S4 beispielsweise beträgt 30 000 Dalton, das des Proteins S19 10 000 Dalton. Sephadex G100 Gel sollte Proteine dieser Größe voneinander trennen. Eine Säule aus Duranglas mit einem Innendurchmesser von 2 cm und einer Länge von 200 cm wurde gefüllt mit entgastem Sephadex G100-Gel in TM4-Harnstoff-Puffer. Die fertig gestopfte Säule wurde mit S100-Proteinen von E. coli abgesättigt, um die Proteinausbeute zu erhöhen, und an eine Boyle-Mariotte'sche Flasche angeschlossen, um einen konstanten Arbeitsdruck zu erreichen (Arbeitsdruck: 100 cm). Nach dem Probenauftrag wurde das Eluat in einem LKB Ultrarac Fraction Collector 7000 gesammelt. Tropfgeschwindigkeit: 1 Tropfen in 10 Sec; jede Fraktion enthielt 2,5 ml.

Die A_{235} -, A_{260} - und A_{280} -Werte einer jeden Fraktion wurden mit einem Zeiss M4QIII Photometer gemessen. Alle Fraktionen, die ein Maximum bei A_{235} hatten, wurden ausgiebig gegen TM4-Puffer dialysiert (3 x 45 Min in 1000 fachen Volumen), danach bei -80°C verwahrt. Aliquots jeder fünften Fraktion wurden einer Elektrophorese für Proteine (der ersten

Dimension der 2-D Elektrophorese) unterworfen, um zu prüfen, welches Protein darin enthalten war. Welche Menge jeder Fraktion pro Versuch zu nehmen sei, richtete sich nach der Exfunktion von 20 μ l Probe in 1 ml H_2O bei 230 nm. Bei 0,1 A_{230} ergaben 5 μ l Probe einen optimalen Wert.

2.8. Elektrophoresen

2.8.1. 1-D Elektrophorese mit Tris-Gelen (Peacock & Dingman, 1967; Loenig, 1967; modifiziert)

Diese Methode trennt Partikel mit unterschiedlichem Molekulargewicht voneinander. Die Ursache der Mobilität ist die Nettoladung der Partikel. In dieser Arbeit wurde diese Methode dazu benutzt, deproteinisierte RNA mit RNA-Protein-Komplexen zu vergleichen.

Das Gel wurde 15 Min entgast, mit den Katalysatoren TEMED und $(NH_4)_2S_2O_8$ vermischt und in Plastikröhrchen gefüllt (Außendurchmesser: 7 mm, Innendurchmesser: 5 mm, Füllhöhe: 12 cm). Anschließend wurde ein Tropfen Wasser aufgeschichtet, damit eine waagerechte Geloberfläche entsteht. Nachdem die Gele polymerisiert waren, wurden sie ohne Probe einem Vorlauf ausgesetzt (2 mA je Gel für 20 Min), um in den Gelen ein gleichmäßiges Ionenmilieu zu errichten. Der Elektrophoresepuffer war Tris-Puffer.

Die Proben (je 2 A_{260}) wurden mit 0,3 Vol BPB-Sucrose vermischt und auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese fand zunächst statt für 20 Min mit 0,5 mA pro Gel, danach für 4 Std mit 2 mA pro Gel. Zum Färben (Proteinfärbung für 15 Min in Amidoschwarz- oder CBB-Lösung, RNAfärbung für 30 Min

in Toluidinblaulösung) wurden die Gele aus den Plastikröhrchen herausgelöst. Das Entfärben der Gelbereiche ohne Probe fand in 0,1% Essigsäure statt.

2.8.2. 1-D Elektrophorese mit SDS-Gelelen (Ceri & Maeba, 1973)

Die im folgenden beschriebene Methode ist für Untersuchungen ribosomaler RNA besonders geeignet, da die Phenolextraktion entfällt. Mit dieser Methode wurden RNA-Präparationen auf Degradation untersucht.

Die Lösungen für das Gel wurden wie die für Tris-Gel behandelt und in Röhrchen gleichen Formats gefüllt. Elektrophoresepuffer war 1 x TEB-SDS-Puffer. Die Proben ($0,5 A_{260}$ in maximal 0,05 ml) wurden mit 0,1 Vol. 10% SDS vermischt, 2 Min bei 80°C inkubiert und rasch auf 0°C abgekühlt. Jeder Probe wurden 0,3 Vol. BPB-Sucrose beigemischt, bevor sie auf ein Gel aufgetragen wurde. Die Elektrophorese fand statt für 2 Std mit 0,5 mA pro Gel, dann für 2 Std mit 1,0 mA pro Gel. Danach wurden die Gele 30 Min in Methanol-Toluidinblau-Lösung gefärbt und in 1% Essigsäure - 20% Methanol-Lösung entfärbt.

2.8.3. 2-D Elektrophorese (Kaltschmidt & Wittmann, 1970 b; Roth & Nierhaus, 1975)

Mit der 2-D Elektrophorese werden ribosomale Proteine aufgrund ihrer spezifischen Nettoladung (1.Dimension) und ihres Molekulargewichts (2.Dimension) identifiziert.

Die Proben (20 bis 30 A_{260} 30S Ribosomen, 3,0c-Partikel oder Säulenfraktionen) wurden, nach eventueller Einengung durch Lyophilisation, 45 Min

bei 0°C in 66% Essigsäure gerührt. Eine Zentrifugation (30 Min/30 000 g) ergab einen RNA-haltigen Niederschlag und einen proteinhaltigen Überstand. Der Überstand wurde dialysiert gegen 2% Essigsäure, lyophilisiert und gelöst in 2 ml Probengel.

Plastikröhrchen (Außendurchmesser: 7 mm, Innendurchmesser: 5 mm, Länge: 10 cm) wurden bis zur Höhe von 4,5 cm mit 5% Gel gefüllt. Die Probe im Probengel wurde darüber geschichtet. Zur schnelleren Polymerisation wurden die Gele mit einer 1000 Watt Glühlampe bestrahlt. Danach wurden die Röhrchen bis zur Höhe von 9,5 cm mit 10% Gel aufgefüllt. An die 10% Gelseite wurde die Anode, an die 5% Gelseite die Kathode gelegt, so daß die wenigen sauren Proteine in das 10% Gel, die basischen in das 5% Gel wanderten. Der Elektrophoresepuffer war 1-D Puffer. Die Elektrophorese lief 15 Std bei 40 V.

Die in den Säulenfraktionen enthaltenen Proteine konnten dann (nach Färbung und Entfärbung) bereits identifiziert werden. Andere Proben wurden anschließend der zweiten Elektrophorese unterworfen.

Dazu wurden die aus den Röhrchen genommenen Gele auf die wie folgt vorbereiteten Platten gelegt. 200 ml entgastes 25% Gel und die Katalysatoren wurden in eine Wanne gegossen. Dort hinein wurde eine Kammer gestellt, die 5 senkrechte, parallele Schlitze (Breite: 4mm, Länge und Höhe: je 10 cm) hat. Wenn die Schlitze unten durch das polymerisierte 25% Gel verschlossen waren, wurden sie 10 cm hoch mit 18% Gel gefüllt. Die 1-D Gele wurden darauf gelegt und mit 18% Gel anpolymerisiert.

Nachdem alles Gel polymerisiert und überflüssiges Bodengel beseitigt worden war, wurde die Kammer in eine Wanne gestellt, die mit 5 parallel geschalteten Elektroden versehen und mit 2-D Puffer gefüllt war. Der obere Teil der Kammer war so konstruiert, daß man ihn ebenfalls mit 2-D Puffer füllen und mit Elektroden versehen konnte. Die oberen Elektroden wurden mit der Anode, die unteren mit der Kathode verbunden. Während der 2-D Elektrophorese wurden 25 Std lang 50 V angelegt. Nach Beendigung des Vorgangs wurden die Platten aus der Kammer gelöst und 15 Min in Amidoschwarzlösung gefärbt. Entfärbt wurde in 1% Essigsäure, bis die nicht proteinhaltigen Stellen der Platten farblos waren.

2.9. Phenolextraktion von RNA

Diese Methode trennt RNA von Proteinen. Proben mit maximal 40 A_{260} pro ml, welche 0,1 Vol. SDS und 2% Bentonitlösung enthalten, wurden mit dem gleichen Volumen Phenol-SSC-EDTA 8 Min lang geschüttelt. Nach 10 Min/12 000 g Zentrifugation wurde die wässrige Phase abpipettiert. Die Phenolextraktion wurde dreimal durchgeführt und der A_{260} -Gehalt gemessen. Nach anschließender Dialyse gegen TM1-Puffer wurde 16S RNA in kleinen Portionen abgepackt und bei -80°C verwahrt.

2.10. Rekonstitution von funktionell aktiven 30S Untereinheiten

2.10.1. Rekonstitution mit einem Schritt

Zu 5 μl mit 1,5 A_{260} phenolisierter 16S RNA in TM1-Puffer werden 50 μl mit TP30 in TM4-Puffer gegeben. Die für diesen Vorgang zusätzlich benötigten Ionen (Traub & Nomura, 1968) wurden in

einem Volumen von 15 μ l beigegeben. 10 ml Ionenmix enthielten außer Aquabidest 0,6 ml 1M Tris-HCl, pH 7,8, 2 ml 2M NH_4Cl , 1,2 ml 1M Mg Acetat, 0,15 ml 0,1 M EDTA und 0,14 ml Mercaptoäthanol. Die Endkonzentrationen waren: 20 mM Tris-HCl, 360 mM NH_4Cl , 20 mM Mg Acetat, 1 mM EDTA und 2 mM Mercaptoäthanol.

Die 70 μ l wurden inkubiert (20 Min/40°C). 50 μ l davon wurden auf die Fähigkeit zur Poly (U) abhängigen Poly(Phe)Synthese untersucht.

2.10.2. Rekonstitution in zwei Schritten

Bei der Rekonstitution von 3oS Untereinheiten in zwei Schritten ist der erste - im Gegensatz zum zweiten - temperaturabhängig. Im ersten Schritt werden Proteine des 3,0c-Partikels, die mittels G100-Säule getrennt worden sind, mit 16S RNA (5 μ l) und Ionenmix (15 μ l) inkubiert (20 Min/40°C). Das Reaktionsvolumen umfaßt wieder 70 μ l. 50 μ l werden in das Poly(Phe)Synthesesystem überführt. Gleichzeitig mit der Poly(Phe)Synthese findet der zweite Schritt der Rekonstitution von 3oS Untereinheiten statt (60 Min/20°C), nachdem TP3o in ausreichender Menge beigegeben worden sind.

Anstelle von 3,0c-Proteinen können auch gereinigte, einzelne Proteine (Hindennach et al., 1971) eingesetzt werden, wenn diese durch Harnstoff reaktiviert worden sind. Dazu wurden sie auf ein Volumen von 0,8 ml eingeengt, 3 x 45 Min gegen TM4-Harnstoff-Puffer und 3 x 45 Min gegen TM4-Puffer dialysiert. Die Extinktion bei 230 nm ergab wieder das Volumen, das dem Versuch beigegeben werden mußte.

2.11. Die polyuridylsäureabhängige Poly (Phe) Synthese (Nierhaus et al., 1973)

Die Poly (U) abhängige Poly (Phe) Synthese ist ein System, in dem in vitro gemessen werden kann, ob Ribosomen ihre biologische Funktion erfüllen können, nämlich Proteine zu synthetisieren.

Das System ist so eingerichtet, daß die ribosomalen Untereinheiten als limitierende Faktoren wirken. Es werden 1 A₂₆₀ native oder rekonstituierte 30S Untereinheiten beziehungsweise 1 A₂₆₀ des während des ersten Rekonstitutionsschritts entstandenen Partikels (plus TP30 Proteine) mit 1 A₂₆₀ der komplementären nativen Untereinheit zusammengebracht.

Nach 1 Std/20°C wird die [¹⁴C] Poly (Phe) Synthese durch die Zugabe eines Tropfens 1% Albumin- und von 3 ml 5% Trichloressigsäurelösung (10 Min/90°C) unterbrochen. Die Menge des synthetisierten radioaktiven Polyphenylalanin, das aus mehr als vier Aminosäuren besteht, wird aus dem Reaktionsgemisch herausgefiltert. Der Filter wurde anschließend mit einer 1:1 Mischung aus Diäthyläther und Äthanol getrocknet, die verbliebene Radioaktivität im Scintillationszähler von Packard in Zerfällen pro Minute gemessen.

Das Poly (U) abhängige Poly (Phe) System enthält in einem Volumen von 85 µl folgende Reagentien: 11,4 mM Tris-HCl, 34 mM NH₄Cl, 11,4 mM Mg Acetat, 0,002 mM ATP, 0,00007 mM GTP, 6,8 mM Mercaptoäthanol, 11,4 mM PEP, KOH und außerdem 3 µl Pyruvatkinase (1 mg/ml), 2 µl tRNA (20 mg/ml), 15 µl S-100, 10 µl Polyuridylsäure (4 mg/ml) und 10 µl [¹⁴C] Phenylalanin (100 000 cpm/ml).

Die ribosomalen Untereinheiten werden in einem Volumen von 90 μ l hinzugefügt. Neben nativen 5oS Untereinheiten handelt es sich dabei um native 3oS Untereinheiten, in vitro rekonstituierte 3oS Untereinheiten (im Falle der Rekonstitution in einem Schritt) oder um RI_{30} - bzw. RI_{30}^* Partikel nebst TP3o (im Falle der Rekonstitution in zwei Schritten).

2.12. Spinco SW4o-Zentrifugation

Festwinkelrotoren trennen ein Gemisch in Niederschlag und Überstand. Bei Schwingbecherzentrifugation wird noch eine Zonierung des Überstandes erreicht, so daß sich Partikel mit unterschiedlichem Sedimentationsverhalten voneinander trennen lassen.

Form und Molekulargewicht der Partikel bestimmen ihr Sedimentationsverhalten. Bei gleichem Molekulargewicht zweier Partikel wird deren Konformation entscheidend.

Für die SW4o-Zentrifugation wurden isoionische Gradienten vorzugsweise aus 3o%- und 5% Rek-Sucrose, sonst aus 3o%- und 5% NTM1-Sucrose in einem Gradientenmischer hergestellt.

Kryogenetische Gradienten entstanden aus diversen homogenen Sucroslösungen durch Einfrieren bei -20°C für 24 Std und Auftauen bei Raumtemperatur (siehe 3.1o.).

Die Probe mit etwa 3 A_{260} wurde in einem Volumen von maximal 0,2 ml aufgeschichtet. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Zentrifugation bei 161 000 g für 15 Std. Anschließend wurde die Extinktion des Inhalts eines jeden Zentrifugenröhrchens bei 270 bis 290 nm mittels eines Zeiss Durch-

lauf-Photometers PM4 gemessen, das Extinktionsprofil mit einem Kipp & Zonen Schreiber BD8 aufgezeichnet. Der Inhalt wurde in Fraktionen abgefüllt. Von den Fraktionen wurden nach Bedarf die Sukrosekonzentration anhand eines Zeiss Refraktometers und die Leitfähigkeit bestimmt.

3. Resultate

3.1. Analyse zweier Konformationen des 3,0c-Partikels

Zusätzlich zu den bereits früher beschriebenen Eigenschaften (Marquardt, 1973) der 3,0c-Partikel, welche aus 3oS Untereinheiten durch LiCl-Behandlung entstehen, konnten die folgenden Ergebnisse gewonnen werden.

3.1.1. Die funktionelle Übereinstimmung der Konformation 3MIII des 3,0c-Partikels mit der RI₃₀* Partikel

3MIII (siehe Abbildung 1a) ist die bevorzugte Erscheinungsform des 3,0c-Partikels nach Inkubation bei 37°C - 40°C für 10 bis 25 Min. Sie bleibt trotz nachfolgender 24stündiger Aufbewahrung bei -60°C erhalten. Derart behandelte Partikel rekonstituieren sich bei 0°C mit den fehlenden Proteinen zu 3oS Untereinheiten, die ebenso aktiv in der Poly (U) abhängigen Poly (Phe) Synthese sind wie native 3oS Untereinheiten (Tabelle 1).

Frisch bei 0°C präparierte 3,0c-Partikel liefern bei einer Analyse durch SW40 Zentrifugation (16 Std/ 35 000 Upm) ein heterogenes Bild (siehe Abbildung 1b). Der größere Teil der Partikel präsentiert sich in der Konformation 3MIV.

Werden nichtinkubierte Partikel mit TP30 bei 0°C rekonstituiert und auf die Fähigkeit geprüft, Poly (Phe) zu synthetisieren, so zeigt sich, daß etwa 25% Aktivität erreicht wird (Tabelle 1).

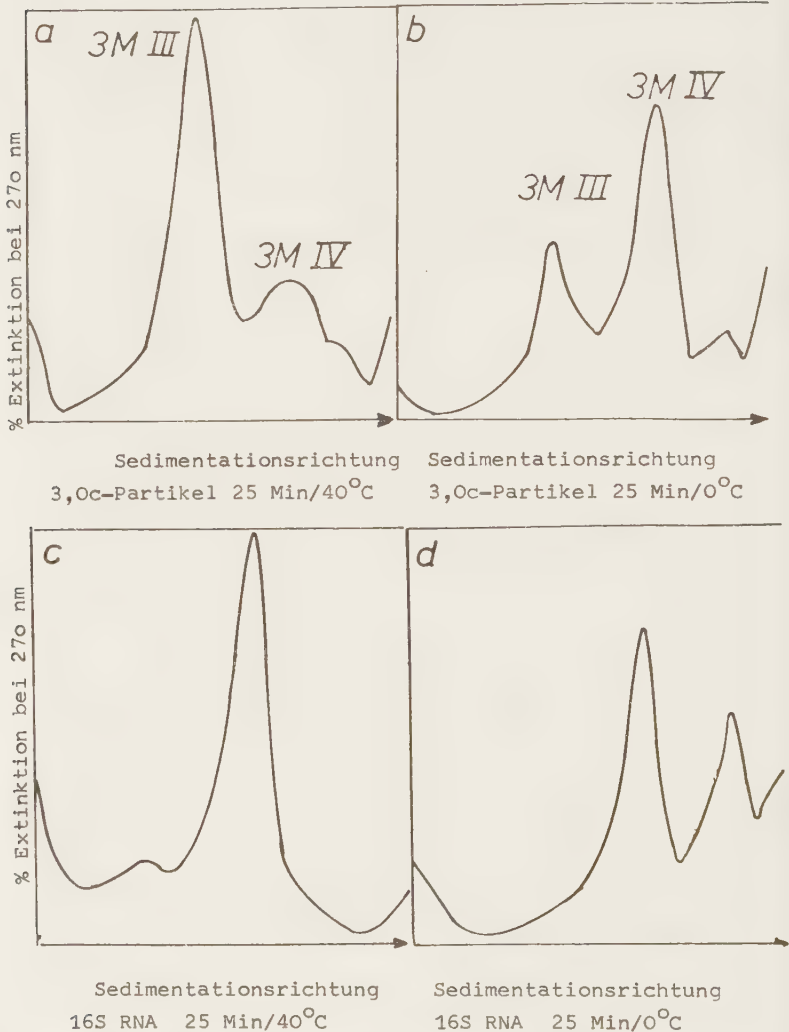
Tabelle 1

Einfluß der Temperatur auf die Rekonstitutionsfähigkeit von 3,0c-Partikeln

	1.Inkubation	2.Inkubation		cpm	% Aktivität
3,0c-Partikel	0°C	0°C	TP30	12 503	25
"	25 Min/40°C	24Std/0°C	"	51 714	99
"	25 Min/40°C	24Std/-60°C	"	50 012	95
30S Unter-einheit	25 Min/40°C	24Std/-20°C	-	52 413	100

Abbildung 1

Gradientenzentrifugation (SW40) von 3,0c-Partikeln und 16S RNA



Die SW40 Zentrifugation fand statt bei 4°C für 16 Std/ 36 000 Upm; jede Probe enthielt 1,5 A₂₆₀ Einheiten; die Gradienten bestanden aus 10%-40% Rek-Sucrose bzw. 10%-40% NTM1-Sucrose.

Es ist naheliegend, diese Aktivität auf die noch vorhandene Population der Konformation 3MIII zurückzuführen. Diese Konformation des 3,0c-Partikels ist damit dem RI_{30}^* Partikel funktionell äquivalent, welches ebenfalls in der Kälte die fehlenden Proteine zu aktiven 3oS Untereinheiten anlagern kann (Traub & Nomura, 1968).

3.1.2. Die Überführung ribosomaler Partikel in einen reversibel inaktiven Zustand durch Inkubation mit LiCl

Die Entstehung größtenteils inaktiver 3,0c-Partikel aus 3oS Untereinheiten bei 0°C ist überraschend. Deshalb wurde der Effekt von LiCl auf die Konformationen 3MIII (aktiv) und 3MIV (inaktiv) untersucht. 3,0c-Partikel wurden im Rekonstitutionsmilieu inkubiert (20 Min/40°C). Danach wurde die Hälfte mit 1 Vol 5M Li TM-Puffer einer zweiten Inkubation (5 Std/0°C) ausgesetzt. Partikel nach der ersten und zweiten Inkubation sowie nicht inkubierte 3,0c-Partikel wurden im SW40 Rotor (16 Std/35 000 Upm) zentrifugiert. Die 20 Min bei 40°C inkubierten Partikel entsprachen erwartungsgemäß der Abbildung 1a, die nicht inkubierten Partikel der Abbildung 1b. Die inkubierten und danach mit LiCl behandelten Partikel aber entsprachen ebenfalls der Abbildung 1b. Daraus folgt, daß LiCl die "aktive" Konformation 3MIII in die "inaktive" Konformation 3MIV überführt hat.

3.2. Analyse des Verhaltens von 16S RNA bei SW40 Zentrifugation und Vergleich mit dem Verhalten von 3,0c-Partikeln

Inkubierte 16S RNA (20 Min/40°C) zeigt bei SW40 Zentrifugation (16 Std/35 000 Upm) einen einheit-

lichen Absorptionsgipfel (siehe Abbildung 1c), nicht inkubierte 16S RNA jedoch zwei verschieden wandernde Konformationen (siehe Abbildung 1d). Eine dieser Konformationen ist Mg^{++} -empfindlich, das heißt bei Mg^{++} Konzentrationen unter 4 mM (z.B. TM1-Puffer) zeigt sich wieder nur ein Absorptionsgipfel (entsprechend Abbildung 1c), unabhängig von der Temperatur.

3,0c-Partikel und 16S RNA zeigen Gemeinsamkeit in der Ausbildung mehrerer Konformationen. Unterschiede bestehen darin, daß nicht inkubierte 16S RNA bei niedriger Magnesiumkonzentration nur noch eine Konformation zeigen kann, während nicht inkubierte 3,0c-Partikel dadurch nicht beeinflußt werden. Letztere bleiben nach einmaliger Inkubation bei 40°C trotz anschließenden Einfrierens bei -60°C stabil, 16S RNA nicht.

Die gemeinsamen Eigenschaften lassen sich dadurch erklären, daß 16S RNA im 3,0c-Partikel mehr als 80% der Masse ausmacht, während die abweichenden Eigenschaften auf das Vorhandensein von Proteinen im 3,0c-Partikel zurückzuführen sein müssen.

3.3. Aktivität und Proteingehalt von 3,0c-Partikeln

Aus Abbildung 1b ist ersichtlich, daß nicht temperaturaktivierte 3,0c-Partikel in verschiedenen Konformationen auftreten. Das Vorkommen von 3MIII erklärt sich aus der Tatsache, daß bei jedem Auftauen der Probe ein kleiner Teil in die aktive Konformation umgewandelt wurde. Ältere, öfter gebrauchte, nicht inkubierte Proben zeigen in der Gradientenzentrifugation einen größeren Anteil 3MIII als frisch präparierte. Dementsprechend zeigen nicht inkubierte 3,0c-Partikel mit zunehmendem Alter einen Anstieg der Aktivität bei der Poly (Phe) Synthese.

Diese Befunde begründeten die Vermutung, daß sich durch Rekonstitution bei 0°C homogene Partikel der Konformation 3MIV darstellen lassen. Deshalb wird im folgenden untersucht, ob die Proteinzusammensetzung der bei 0°C formierten Partikel der 3,0c-Partikel oder der bei 40°C gebildeten Partikel aus 16S RNA und Protein der 3,0c-Partikel entspricht.

Versuchsbeschreibung:

Es wurden sechs verschiedene Rekonstitutionen durchgeführt. Fünf davon enthielten je $100 A_{260}$ 16S RNA und optimale Mengen von 3,0c-Proteinen, die vorher durch Essigsäureextraktion von der RNA getrennt worden waren. Die sechste enthielt ebenfalls $100 A_{260}$ 16S RNA, jedoch SP3,0- statt 3,0c HAC-Proteine. Das Volumen war jeweils 1,2 ml, das Ionenmilieu entsprach Rekonstitutionsbedingungen. Zwei Ansätze mit 16S RNA und 3,0c HAC Proteinen wurden 25 Min bei 0°C (No 1 und 2), die vier übrigen (No 3 bis 6) 25 Min bei 40°C inkubiert (Tabelle 2a).

Alle sechs wurden 5 Std bei 45 000 Upm im Beckman 50 Ti Rotor zentrifugiert. Die Sedimente wurden in TM4-Puffer gelöst. Die Ansätze No 1 und 3 und die Überstände wurden für die 2-D Elektrophorese von Proteinen aufgearbeitet. Von den übrigen gelösten Sedimenten wurde die A_{260} Menge bestimmt. Je $1 A_{260}$ wurde abgenommen für die RNA-Analyse mittels 1-D Elektrophorese, je ein weiteres für SW40 Gradientenzentrifugation.

Die resuspendierten Sedimente der Ansätze No 2 und 4 wurden mit TP30 inkubiert (25 Min/ 0°C), das des Ansatzes No 5 mit SP3,0-Proteinen und das letzte (No 6) mit 3,0c HAC-Proteinen (ebenfalls 25 Min/ 0°C). In allen Ansätzen wurden durch Ionenzugabe Rekonstitutionsbedingungen geschaffen. Wieder wurde im 50 Ti Rotor zentrifugiert und die Sedi-

mente in TM-Puffer resuspendiert. Nach der Bestimmung der A_{260} Werte je ml wurde je 1 A_{260} in das Poly (Phe) System eingesetzt. Die Überstände und Sedimente der Rekonstitutionen No 2 und 5 wurden ebenfalls der 2-D Elektrophorese für Proteine unterworfen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2a

Die Poly (Phe) Synthese-Aktivität der rekonstituierten Partikel

No der Rekonstitution	1.Zentrifugation			2.Zentrifugation			cpm	%
	RNA	Proteinmischung	1.Inkubation	Proteinmischung	2.Inkubation			
No2	16S	3,0c HAC	25 Min/0°C	TP3o	0°C		920	2
No4	"	"	25 Min/40°C	TP3o	"		21345	41
No5	"	"	"	SP3,0	"		21221	40
No6	"	SP 3,0	"	3,0c HAC	"		4449	9
Kontrollen:								
	16S	TP3o	25 Min/40°C	-	-		53505	102
	-	TP3o	"	-	-		1787	3
	30S	Unterein.	"	-	-		52417	100
	16S	-	"	TP3o	0°C		2561	5
	-	TP3o	"	16 RNA	"		1136	2

Tabelle 2b

Die 2-D Elektrophorese als Nachweis des Rekonstitutions-
erfolgs

No der Rekon- stitu- tion	Fraktion	Inkubation		nachweisbare Proteine von 3oS
		1.	2.	
1	1.Sediment	0°C	-	4,7,8,15,16,(9,19,20)(±13)
3	"	40°C	-	4,7,8,15,16 (9,13,19,20)
1 u. 2	1.Überstand	0°C	-	8,15
3,4 u. 5	"	40°C	-	8,15
2	2.Sediment	0°C	0°C	2-D Bild nicht auswertbar
4	"	40°C	"	± 3oS Kontrolle
2	2.Überstand	0°C	"	2,4,15 oder 16
5	"	40°C	"	4,15 oder 16
Kon- trol- len:				
	3,0c HAC			4,7,8,15,16,(9,13,19,20)
	SP 3,0			1,2,3,5,9,12,13,14,18,20 (4,7,10,15/16/17)

In der RNA Elektrophorese zeigten die Proben No 2 und 4 keinen Unterschied zur 16S RNA Kontrolle. Die Ergebnisse der SW40 Zentrifugation waren enttäuschend. Der Anteil der Konformation 3MIV in der Probe No 2 war kleiner als der der Konformation 3MIII und vor allem nicht größer als bei nicht inkubierten 3,0c-Partikeln, welche als Kontrolle der gleichen Zentrifugation unterworfen waren.

Die Probe No 2 hat bei der Poly (Phe) Synthese keine über den Leerwert hinausgehende Aktivität (siehe Tabelle 2a). Dagegen haben die Proben No 4 und 5 jeweils 40% Aktivität. Der Unterschied zwischen 4 und 5 besteht darin, daß No 4 während der 2. Inkubation TP30, No 5 aber nur SP3,0-Proteine angeboten worden sind, welche die 30S Proteine enthalten, die den 3,0c HAC-Proteinen fehlen. Die Zugabe von mehr Proteinen als zur Komplettierung der 3,0c HAC-Proteine zu TP30 notwendig ist, bewirkt

keine Stimulierung der Aktivität.

Der Vergleich der Aktivitäten der Probe No 2 mit No 4 bzw. No 5 bestätigt, daß 40°C für 25 Min während der 1. Inkubation für die Aktivität notwendig sind.

Durch die Probe No 6 wird gezeigt, daß in der Rekonstitution während der 1. Inkubation unbedingt 3,0c-Proteine, nicht jedoch SP3,0-Proteine enthalten sein müssen. Dadurch wird bewiesen, daß die Proteinfraktionen sukzessiv an das sich rekonstituierende Partikel während der in vitro Rekonstitution binden. Daß Probe No 6 dennoch 9% Aktivität ergibt, erklärt sich dadurch, daß die Proteinanalyse der SP3,0 Proteinfraktion geringe Überlappung mit der 3,0c Proteinfraktion zeigt (Tabelle 2b). Die Ergebnisse der 2-DElektrophorese für Proteine erlauben den Schluß (siehe Tabelle 2b), daß die Partikel, die unter Rekonstitutionsbedingungen sowohl bei 0°C (Sediment No 1) als auch bei 40°C (Sediment No 3) entstehen, einander gleichen. Ein geringfügiger Unterschied ist darin zu sehen, daß Protein S13 bei 0°C schlechter eingebaut wird als bei 40°C. Das Proteinbild beider Partikel ist sonst mit dem Bild der 3,0c-Partikel identisch. Es ist bemerkenswert, daß trotz des Vorhandenseins der gleichen Komponenten in den Sedimenten No 1 und 3 sowie den 3,0c-Partikeln keine Aktivität in der Poly (Phe) Synthese gefunden wird, wenn nicht bei 40°C inkubiert wird (siehe Tabelle 2a No 2). In den Überständen, die zu No 1 bzw. No 3 gehören, waren nur die Proteine S8 und S15 nachweisbar. Diesen Befund möchte ich als Ausdruck mangelhaften Einbaus dieser Proteine unter Rekonstitutionsbedingungen interpretieren. Ein mangelhafter Proteineinbau würde erklären, daß die Aktivität der

Partikel No 4 bzw. No 5 (Tabelle 2a) lediglich 40% beträgt.

Die Überstände von No 2 und No 5 nach der zweiten Zentrifugation haben gemeinsam, daß sie nur wenige Proteine enthalten (Tabelle 2b). Bei No 2, dessen 1. und 2. Inkubation bei 0°C verlief, wurde vermutet, daß sich viele Proteine im Überstand finden lassen würden, vor allem solche, die man in der SP3,0 Proteinfraktion findet. Jedoch konnten offensichtlich selbst die Proteine der SP3,0 Proteinfraktion in der Kälte binden, da sich der zweite Überstand von dem von No 5 nur durch das Vorkommen von Protein S2 unterscheidet.

Das Vorkommen von Protein S15 in diesen beiden Überständen ist nicht überraschend. Dieses Protein konnte auch bei der 1. Rekonstitutionsstufe trotz Inkubation bei 40°C nicht optimal eingebaut werden. In SP3,0-Proteinen ist S15 enthalten. Protein S8 jedoch, das zusammen mit S15 im Überstand der 1. Zentrifugation gefunden wurde, erscheint nicht im Überstand der 2. Zentrifugation, obwohl es bei Probe No 2 durch die Zugabe von TP30 wieder ungebunden zur Verfügung gestanden hat. Es muß also bei 0°C während der 2. Inkubation eingebaut worden sein. Da die Proteine S4 und S16 nicht im Überstand der 1. Zentrifugation, wohl aber in den Sedimenten bei der Zentrifugation gefunden wurden, erklärt sich ihr Nachweis im Überstand der 2. Zentrifugation durch ihr Vorhandensein in TP30 beziehungsweise SP3,0 Proteinen.

Das Sediment von No 4 hat nach der 2. Zentrifugation die gleichen Proteine wie 30S Untereinheiten. Das bedeutet, daß 0°C während der 2. Inkubation für die Anlagerung der fehlenden Proteine ausreicht.

In der 3,0c-Protein- und der SP3,0-Proteinfraktion

wurden bis auf die Proteine S6, S11 und S21 alle Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit gefunden. Das Fehlen der Proteine wird erklärlich durch den Befund, daß bei zu langer Dauer der 1. Dimension der Elektrophorese Protein S6, bei zu langer Dauer der 2. Dimension Protein S21 aus dem Gel wandert. Protein S11 wandert häufig - auch in TP30 Präparationen - größtenteils wie Protein S9 und ist daher schwierig zu identifizieren.

3.4. Studien zur Fähigkeit der 3,0c-Proteine, an 16S RNA zu binden

Können alle Proteine, die im 3,0c-Partikel gefunden werden, einzeln an 16S RNA binden? Zu direkter und spezifischer Bindung an 16S RNA sind die einzelnen Proteine S4, S7, S8, S13, S15 und S20 in der Lage. Dies wurde in verschiedenen Laboratorien gefunden. (Mizushima & Nomura, 1970; Schaup, Green & Kurland, 1970; 1971; Nashimoto et al., 1971; Garrett et al., 1971; Zimmermann et al.; 1972; Marquardt, 1973; Muto et al.; 1974; Held et al.; 1974) Diesbezügliche Untersuchungen über die ebenfalls im 3,0c-Partikel befindlichen Proteine S9, S16 und S19 sind bisher ohne positives Ergebnis geblieben.

Wichtig ist auch die Beantwortung der Frage, ob mit dem vorliegenden Rekonstitutionssystem die soeben erwähnten Befunde bestätigt werden können. Eine Übereinstimmung der Ergebnisse kann als Bestätigung der bisherigen Arbeit gelten; unterschiedliche Ergebnisse würden eine Systemkontrolle erforderlich machen.

Zu dem Versuch wurden isolierte Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit benötigt. Der Versuch

selbst bestand darin, daß je ein einzelnes Protein mit RNA unter Rekonstitutionsbedingungen inkubiert wurde. Anschließend wurde das Rekonstitutionsgemisch auf ein dreiprozentiges Tris-Gel aufgetragen und einer 1-D Elektrophorese für RNA-Proben bei pH 8 unterworfen. Die Proteine des 3,0c-Partikels haben einen isoelektrischen Punkt von etwa pH 10 und sind daher bei pH 8 positiv geladen. RNA hat einen weit niedrigeren isoelektrischen Punkt - ob sie Proteine gebunden hat oder nicht - weswegen sie bei pH 8 negativ geladen ist. Damit lassen sich RNA-Protein-Komplexe bei pH 8 von ungebundenen Proteinen trennen. Die Gele wurden nach der Elektrophorese entweder mit Coomassie Brilliant-Blue (Proteinfärbung) oder mit Toluidinblau (RNA-Färbung) angefärbt. Als Kriterium der Bindungsspezifität soll gelten, daß sich nur 16S RNA-haltige, elektrophoretisierte Rekonstitutionspartikel durch CBB anfärben lassen, nicht jedoch 23S RNA- oder gar tRNA-haltige.

In dem Rekonstitutionsansatz für die Bindungsexperimente wurde der 16S RNA eine Proteinmenge zugegeben, die (zusammen mit den noch fehlenden Proteinen) für die Rekonstitution aktiver 30S Untereinheiten optimal ist.

Mit Ausnahme von Protein S9 wurden alle Proteine des 3,0c-Partikels (siehe Tabelle 2b) und außerdem Protein S12 auf ihre Fähigkeit untersucht, an 16S RNA bzw. 23S RNA unter Rekonstitutionsbedingungen zu binden. Die Bindungsversuche fanden sowohl bei 0°C als auch bei 40°C statt. Die Ergebnisse der Elektrophorese sind in Tabelle 3 und Abbildung 2 wiedergegeben. Im Parallelversuch wurden deproteinsierte 16S RNA bzw. 23S RNA Rekonstitutionsbedingungen ausgesetzt und anschließend elektrophoretisiert, desgleichen alle Proteine

und tRNA (10 Min/40°C). Kontrollen waren 30S- und 50S Untereinheiten.

Tabelle 3

Die Bindungen von S Proteinen an 16S-, 23S- und tRNA bei 0°C und 40°C

Bindungen an:				
Protein	16S RNA 0°C	16S RNA 10 Min/ 40°C	23S RNA 10 Min/ 0°C	t RNA 10 Min/ 40°C
S4	++	++	(+)	
S7	(+/-)	(+)	-	
S8	(+)	(+)	(+)	
S12	-	-	-	
S13	++	++	++	
S15	+	(+)	-	
S16	+	+	(±)	
S19	(+)	(+)	-	
S20	++	++	++	
Σ Proteine	++	++	++	++
-	-	-	-	-

Symbole: +++ = starker Proteingehalt, + = guter Proteingehalt, (+) = schwacher Proteingehalt, (+/-) = Protein nur in Spuren nachweisbar

Deproteinisierte RNA läßt sich nur mit Toluidinblau und nicht mit CBB anfärben. RNA-Protein-Komplexe ließen sich dagegen auch mit CBB färben. CBB-Färbung kann also als Nachweis für Proteinbindung an RNA gelten. Die Banden der Färbung mit Toluidinblau deproteinisierter RNA stimmen überein mit denen der CBB-Färbung bei RNA-Protein-Komplexen. Das bedeutet, daß in diesem System die Proteinbindung die Mobilität der RNA nicht beeinträchtigt (siehe Abbildung 2b). Es fällt auf, daß die RNA in einigen RNA-Protein-Komplexen degradiert ist, die Bruchstücke aber ebenfalls Proteinbindung erlauben.

Abbildung 2

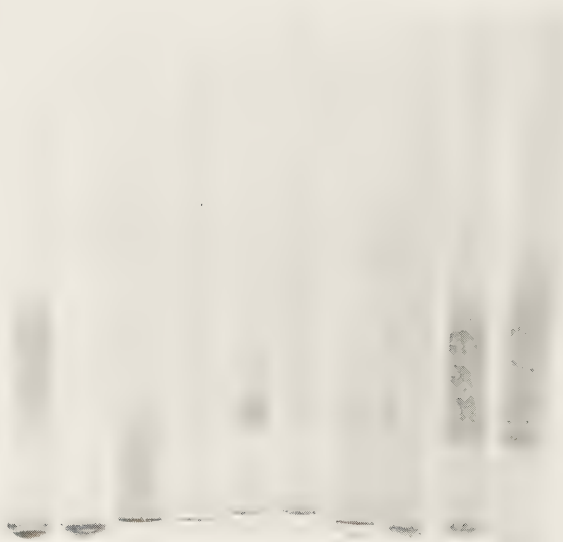
- a) Rekonstitution von einzelnen S Proteinen und
16S RNA bei 0°C in der RNA-DElektrophorese,
nach Färbung mit CBB (16S RNA Kontrolle siehe
Abb. 2b)

S4 S7 S8 S12 S13 S15 S16 S19 S20 -



- b) Rekonstitution von einzelnen S Proteinen und
16S RNA für 10 Min bei 40°C in der RNA+1-Elek-
trophorese, nach Färbung mit CBB (bzw. nackten
16S RNA mit Toluidinblau, siehe rechtes Gel:-)
Auftrag: 16S RNA +

S4 S7 S8 S12 S13 S15 S16 S19 S20 -



- c) Rekonstitution von einzelnen S Proteinen und 23S RNA bei 0°C in der RNA-1-DElektrophorese, nach Färbung mit CBB ,



Auftrag: S4 S7 S8 S12 S13 S15 S16 S19 S20 -
+ 23S RNA

Die Bindung einzelner Proteine an RNA erbrachte folgende Ergebnisse (siehe Tabelle 3): Protein S12 bindet weder an 16S RNA noch an 23S RNA. Das beweist, daß die Fähigkeit der anderen untersuchten Proteine, an RNA zu binden, eine Eigenschaft ist, die sie unabhängig von den Untersuchungsbedingungen haben.

Alle untersuchten 3,0c-Proteine können einzeln an 16S RNA binden, und zwar sowohl bei 0°C als auch bei 40°C. Die Proteine S7 und S19 binden in beiden Fällen weniger als andere Proteine. In einem Wiederholungsversuch wurde jedoch deutliche Bindung von S7 gefunden. Die Proteine S4, S13 und S20

binden überdurchschnittlich gut sowohl bei 0°C als auch bei 40°C. Protein S16 bindet normal bei beiden Temperaturen.

Die 3,0c-Proteine können mit Ausnahme von S7 und S19 auch an 23S RNA binden (siehe Abbildung 2c). Deutliche Bindung wurde bei den Proteinen S2o, S13, S4 und S8 bemerkt. S13 verliert seine Fähigkeit, an 23S RNA zu binden, wenn die Rekonstitution bei 40°C stattfindet (Ergebnis eines nicht vorgestellten Versuchs). Die Bindung von S2o ist bemerkenswert, da dieses Protein identisch ist mit dem Protein L26 aus der großen ribosomalen Untereinheit. (Tischendorf et al., 1974)

Gemessen an den eingangs postulierten Kriterien für spezifische Bindung muß festgestellt werden, daß bei diesen Versuchsbestimmungen lediglich S7 und S19 spezifisch an 16S RNA binden. Alle anderen Proteine binden mehr (S8, S13, S2o) oder weniger (S4, S15, S16) unspezifisch an 23S RNA. Die mangelnde Spezifität der Proteinbindung unter den vorliegenden Rekonstitutionsbedingungen geht auch aus dem Befund hervor, daß Proteine selbst an tRNA binden (siehe Tabelle 3).

3.5. Der Einfluß des Ionenmilieus auf die Spezifität der Bindung von 3,0c-Proteinen an 16S RNA

Das Vorkommen von spezifischer neben unspezifischer Bindung von Proteinen an 16S RNA weist darauf hin, daß das Ionenmilieu während der Rekonstitution nicht optimal für die Bindungsfähigkeit aller Proteine ist. Aus diesem Grund wurde ein Protein, das spezifische Bindung an 16S RNA (S7) und je eins, das mehr (S2o) oder weniger (S15) stark unspezifische Bindung an 23S RNA gezeigt hätte, bei 40°C unter verschiedenen Ionenbedingungen sowohl mit

16S RNA als auch mit 23S RNA rekonstituiert und dann einer 1-D Elektrophorese in Tris-Gelen für RNA-Untersuchungen unterzogen.

Die Rekonstitution fand unter verschiedenen Ammonium- bzw. Magnesiumkonzentrationen statt, so daß sechs verschiedene Ionenbedingungen vorlagen (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4

Die Bindung von Proteinen an RNA unter verschiedenen Ionenkonzentrationen

No der Re- kon- sti- tu- ti- on	NH ₄ ⁺	Mg ⁺⁺	Protein S7 bin- det bei 40°C an		Protein S15 bin- det bei 40°C an		Protein S2o bin- det bei 40°C an	
			16S RNA	23S RNA	16S RNA	23S RNA	16S RNA	23S RNA
1	75 mM	20 mM	-	-	+	+	++	++
2	150 mM	"	(+/-)	-	+	+	++	(+)
3	300 mM	"	(+/-)	-	+	+	++	(+)
4	75 mM	4 mM	(+)	-	+	+	++	++
5	150 mM	"	+	-	+	-	++	+
6	300 mM	"	-	-	(+)	-	+	(+/-)

Alle übrigen Rekonstitutionskomponenten wurden nicht verändert. Symbole siehe Tabelle 3

Rekonstitution No 3 (siehe Tabelle 4) zeigt das Ergebnis von Proteinbindung unter Standardbedingungen (Traub & Nomura, 1968). Es fällt auf, daß Protein S7 schlecht und Protein S15 unspezifisch bindet. Rekonstitution No 5 führt bei den Proteinen S7 und S15 zu spezifischer Bindung an 16S RNA. Bei Protein S2o ist die Bindung an 16S RNA deutlich besser als an 23S RNA.

Allgemein muß festgestellt werden, daß bei 20 mM Magnesium unspezifische Bindung von Proteinen an

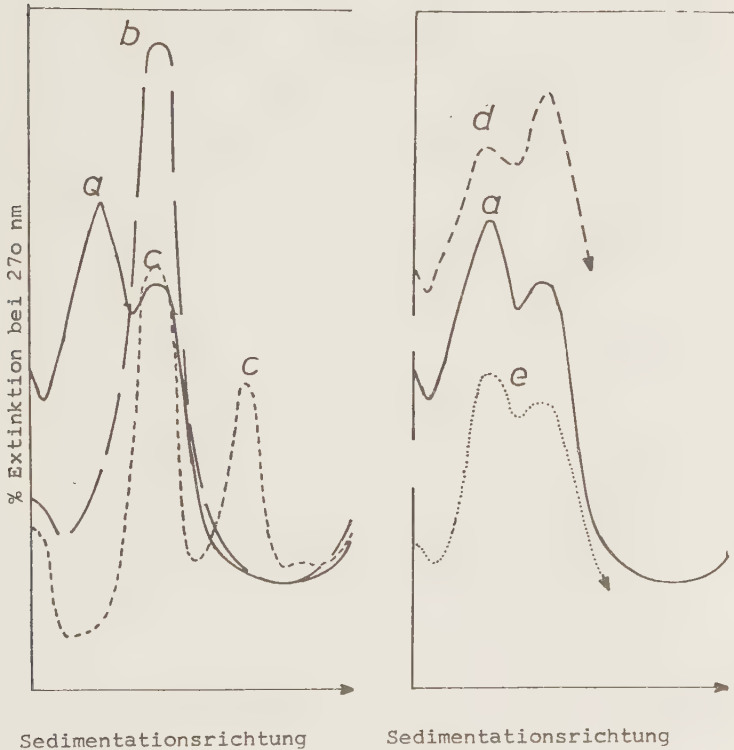
23S RNA vermehrt beobachtet werden kann. Das optimale Ionenmilieu für die Untersuchung spezifischer Bindung ribosomaler Proteine an 16S RNA scheint bei 4 mM Mg^{++} und 150 mM NH_4^+ zu liegen.

3.6. Der Einfluß einzelner 3,0c-Proteine auf die Bildung der Konformation 3MIII

Nach der positiven Feststellung, daß alle 3,0c-Proteine (allein Protein S9 wurde nicht untersucht) einzeln an 16S RNA binden können, stellt sich die Frage, ob aus verschiedenen 3,0c-Proteinen und 16S RNA formierte Partikel Konformationen zeigen, die den 3,0c-Partikeln ähnlich sind (siehe Abbildung 1a und 1b).

Abbildung 3

Die Auswirkung des Fehlens eines Proteins bei der Bildung von 3,0c-Partikeln



a = 16S RNA + 3,0c-Proteine, rekonstituiert bei 40°C;
b = 16S RNA unter Rekonstitutionsbedingungen (Traub & Nomura, 1968) bei 40°C ($\hat{=}$ Abbildung 1c); c = 16S RNA allein bzw. 3,0c-Proteine mit 16S RNA unter Rekonstitutionsbedingungen bei 0°C; d = 16S RNA + 3,0c-Proteine minus S16 unter Rekonstitutionsbedingungen bei 40°C; e = 16S RNA + 3,0c-Proteine minus S4 bzw. S7, S8, S13, S15, S19, S20 unter Rekonstitutionsbedingungen bei 40°C

Dieser Vergleich wurde mittels SW40 Gradientenzentrifugation angestellt (5,5 Std/36 000 Upm; 3% - 10% Rek-Sucrose). Auffallend ist, daß nackte, bei 0°C inkubierte 16S RNA das gleiche Bild ergibt wie 16S RNA und 3,0c Proteine bei 0°C (siehe Abbildung 3c), obwohl bei 0°C Proteinbindung stattfindet (siehe Abbildung 2b). Die Form, die bei LiCl Behandlung von 30S Untereinheiten bei 0°C auftritt (Konformation 3MIV, siehe Abbildung 1b), läßt sich der Abbildung 3a nicht eindeutig zuordnen, weil deren Maxima mit den Maxima von 16S RNA (Abbildung 3b und 3c) Überlappung zeigt. Besondere Beachtung verdient der Befund, daß das Hauptmaximum der Kurve a der Abbildung 3 deutlich von den Kurven b und c abgegrenzt ist (unterschiedliche S_{20w} -Werte). Das ist Ausdruck einer Konformationsänderung der bei 40°C rekonstituierten 3,0c-Partikel gegenüber 16S RNA bzw. Rekonstitutionen mit einer Inkubationstemperatur von 0°C. Das Hauptmaximum der Abbildung 3a entspricht der Konformation 3MIII der 3,0c-Partikel.

Im folgenden Experiment wird untersucht, welche Auswirkung das Auslassen eines einzigen Proteins während der Rekonstitution bei 40°C auf die Bildung des Hauptmaximum der Abbildung 3a hat. Die verschiedenen Rekonstitutionen wurden einer SW40 Zentrifugation (5,5 Std/36 000 Upm; 3% - 10% Rek Sucrose) unterworfen, die Ergebnisse sind in Abbildung 3d und e dargestellt.

Eine qualitative Veränderung gegenüber Abbildung 3a ist nur festzustellen, wenn Protein S16 ausgelassen wurde. Der dem Hauptmaximum von 3a entsprechende Anteil wird kleiner, der dem kleineren Maximum von 3a entsprechende Anteil wird größer.

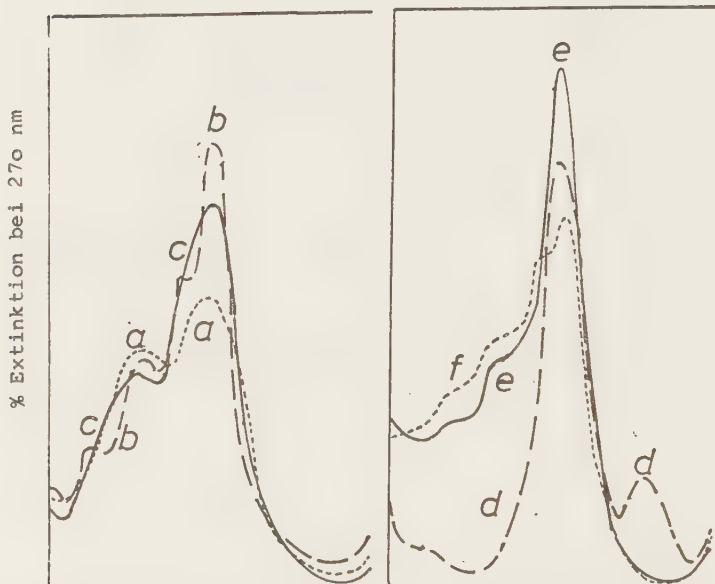
Da das Auslassen jedes der anderen 3,0c-Proteine aus der Rekonstitution bei 40°C keine Veränderung der Maxima bewirkte (Abbildung 3e), wurde untersucht, ob die Bindung dieser Proteine einzeln an 16S RNA eine signifikante Konformationsänderung herbeiführen kann. In einem Vorversuch wurden zwei verschiedene Gruppen mit jeweils vier 3,0c-Proteinen mit 16S RNA bei 40°C rekonstituiert und dann zentrifugiert. Der eine Ansatz enthielt die Proteine S7, S8, S15 und S19 (Abbildung 4b), der andere die Proteine S4, S13, S16 und S20 (Abbildung 4c). Beide Ansätze liefern ein qualitativ gleiches Bild mit signifikanter Konformationsänderung gegenüber nackter 16S RNA. Das weist darauf hin, daß nicht ein Protein allein für die Konformationsänderung verantwortlich ist, sondern mindestens zwei (in jeder Gruppe mindestens eins).

Diese Vermutung wird unterstützt durch die Befunde der Versuche, in denen jeweils ein Protein mit 16S RNA inkubiert wurde. Fand die Rekonstitution bei 0°C statt, wurde immer das Profil 4d gemessen. Bei 40°C Inkubationstemperatur ergaben die Messungen das Profil 4e (mit den Proteinen S4, S7, S15, S16 und S19) oder ein qualitativ gleiches mit geringerem Anteil an veränderter Konformation (mit den Proteinen S8 und S20).

Rekonstitutionen bei 40°C aus zwei verschiedenen Proteinen (eins von ihnen war immer S16) und 16S RNA ergaben immer Profile, die 4f ähnlich waren. Dabei traten manchmal Schultern auf, wie sie schon in Abbildung 4b aufgefallen sind.

Abbildung 4

Die Bindung verschiedener Proteinkompositionen an
16S RNA



a = Abbildung 3d = 16S RNA + 3,0c Proteine minus S16;
b = 16S RNA + S7, S8, S15, S19 40°C; c = 16S RNA + S4, S13,
S16, S20 40°C; d = 16S RNA + jedes der 3,0c Proteine
einzeln bei 0°C; e = 16S RNA + jedes der 3,0c Proteine
einzeln bei 40°C; f = 16S RNA + (S16+S4)(S16+S7)
(S16+S8)(S16+S13)(S16+S15)(S16+S19)(S16+S20)

Es kann keinem Protein die Urheberschaft für die
Konformation zugesprochen werden. Vielmehr wird
die Konformationsänderung durch das Vorhandensein
mehrerer Proteine stimuliert (vergleiche Abbildung
4e mit 4f, bzw. 4a oder 3e).

Die Zentrifugation von Rekonstitutionsgemischen
bietet sich an als eine weitere Technik, Protein-

bindung an 16S RNA nachzuweisen. Es ist auch mit dieser Methode möglich, das Zustandekommen einer RNA-Protein-Wechselwirkung durch eine spezifische Konformationsänderung des Komplexes anzuzeigen. Die Konformationsänderung gegenüber deproteinisierter RNA ist also ein Maß für die Bindung von Proteinen an RNA.

Mit dieser Methode konnte ein weiterer Beweis erbracht werden, daß die Proteine S16 und S19 an 16S RNA binden können.

3.7. Der Einfluß des Poly (Phe) Synthese-Systems auf den Rekonstitutionsprozeß

Die Aktivität in vitro formierter Partikel wird festgestellt, indem ein Aliquot der Rekonstitutionsprobe nach der Inkubation in das Poly (Phe) Synthesystem überführt wird. Dabei wird angenommen, daß der Rekonstitutionsprozeß vor der Überführung beendet ist. Diese Annahme soll im folgenden untersucht werden.

Wenn 16S RNA und 3,0c-Proteine mit der komplementären Proteinfraction SP3,0 inkubiert wurden (20 Min/40°C) und anschließend - in Gegenwart von 50S Untereinheiten - im Poly (Phe) Synthese-System die Aktivität der entstandenen Partikel festgestellt wurde, konnten 60% Aktivität im Vergleich zu nativen 30S Untereinheiten gemessen werden (siehe Tabelle 5). Überraschenderweise zeigte die bei 0°C inkubierte, sonst gleich behandelte Kontrolle eine signifikante Aktivität von 30%. Der Leerwert hingegen hat 2% Aktivität. Als Leerwert wurde die Aktivität bezeichnet, die gemessen wird, wenn 16S RNA nur mit 3,1c-Proteinen und 50S Untereinheiten inkubiert worden ist, da wegen unvollstän-

diger 3oS Untereinheiten Polyphenylalanin nicht synthetisiert werden kann.

Tabelle 5

Die Aktivität von in vitro formierten RI_{30}^* Partikeln im Poly (Phe) Synthese-System nach Nierhaus et al. (1973) bei 30°C/45 Min

				Formierungs- temperatur	cpm	%
16S	RNA + 3,0c-Proteine			20 Min/0°C	920	1,9
"	" + " + SP3,0-Proteine			20 Min/0°C	14961	30,9
"	" + " + "			20 Min/40°C	28860	59,7
3oS Untereinheiten				20 Min/40°C	48317	100

Es wurde vermutet, daß die Bedingungen, die im Poly (Phe) System herrschen, die Rekonstitution zu einem gewissen Grad erlauben. Um diese Hypothese zu testen, wurden SP3,0-Proteine beziehungsweise TP30, die zur Komplettierung von RI_{30}^* Partikeln zu 3oS Untereinheiten notwendig sind, direkt in das Poly (Phe) Synthesystem gegeben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6

Die Auswirkung der Rekonstitution im Poly (Phe) Synthesystem auf die Aktivität rekonstituierter Partikel

Zugabe in das Rekonstitutionssystem				Inkub. Temp. Rekonst.	Zugabe in das Poly (Phe) System	cpm	%
16S + RNA	3,0c HAC-Proteine	-		0°C	-	1081	2,3
" + "	"	+ SP3,0 Proteine		0°C	-	14744	31,2
" + "	"	+ "		40°C	-	41127	87
" + "	"	-		40°C	+ SP3,0 Prot.	27494	58,3
" + "	"	-		0°C	"	12878	27,3
" + "	TP30 Proteine	-		0°C	-	18351	38,9
" + "	"	-		40°C	-	47181	100
"	-	-		0°C	+ TP30	16572	35,1
"	-	-		40°C	+ TP30	19025	40,3

Inkubation für die Poly (Phe) Synthese war 45 Min/ 30°C; Inkubation für die Rekonstitution dauerte 20 Min bei 40°C bzw. 0°C

Wenn TP30 Proteine erst in das Poly (Phe) Synthesystem zugegeben werden, kann dennoch signifikante Aktivität gemessen werden (35-40%). Dadurch wird die Vermutung experimentell bestätigt, daß während der Poly (Phe) Synthese eine Rekonstitution möglich ist. Die gleiche Aktivität wird bei der Rekonstitution im Rekonstitutionssystem bei 0°C gemessen. Damit ist es schwierig, die tatsächliche, durch das Rekonstitutionssystem verursachte Aktivität zu bestimmen, weil der im Poly (Phe) System gemessene Wert zum Teil durch eine hier selbst erfolgte Rekonstitution verursacht wird.

Werden 16S RNA und die Proteine der 3,0-Partikel im Rekonstitutionssystem bei 40°C inkubiert und die komplementären SP3,0 Proteine im Poly (Phe) Synthesystem dazugegeben, werden 58% Aktivität gemessen. Das bedeutet, daß die Bedingungen im Poly (Phe) System für die 3oS Totalrekonstitution nicht optimal sind, da Rekonstitutionen im Rekonstitutionssystem bei 40°C zu 3oS Untereinheiten mit 87% bzw. 100% Aktivität führten.

3.7.1. Optimierung der Ionenkonzentration des Poly (Phe) Systems für den zweiten Rekonstitutionsschritt (3,0c-Partikel → 3oS)

Für die weiteren Untersuchungen ist es von Vorteil, die Rekonstitution im Poly (Phe) System dahingehend zu optimieren, daß die Rekonstitution von 3,0c-Partikeln plus SP3,0 Proteine zu 3oS Untereinheiten ca. 100% Aktivität verursacht. Das Ergebnis dieser Optimierungsversuche ist, daß das gewünschte Ziel erreicht wird, wenn im Poly (Phe) System folgende Endkonzentrationen herrschen: 250 mM NH_4^+ und 25 mM Mg^{++} . Die Ergebnisse von Rekonstitutionen unter diesen Bedingungen zeigt Tabelle 7.

Tabelle 7

Die Rekonstitution von 3,0c-Partikeln mit SP3,0 Proteinen im Poly (Phe) System zu 90% aktiven 30S Untereinheiten

Rekonstitution im Rekonstitutionssystem						Rekonstitution im Poly(Phe) System (250 mM NH_4^+ /25 mM Mg^{++})	cpm	%
16S RNA	3,0c	HAc	-	10 Min/40°C		-	1092	2,3
		Proteine						
"	+	"	-	10 Min/40°C		+ SP3,0 Proteine	42718	92
"	+	"	-	60 Min/40°C		+ "	43034	93
"	+	"	+ SP3,0 Prot.	10 Min/40°C		-	42527	92
"	+	"	+	60 Min/40°C		-	42608	92
30 Untereinheiten	-			10 Min/40°C		-	46315	100

Gleichhohe Aktivität wird gefunden, wenn die SP3,0 Proteine in das Rekonstitutionssystem oder in das Poly (Phe) System gegeben werden. Schon eine Inkubationsdauer von 10 Min im Rekonstitutionssystem ergibt Werte, die gleich gut sind wie die von 60 Min Inkubation.

6.7.2. Der Einfluß der während der Poly (Phe) Synthese herrschenden Inkubationstemperatur auf die Rekonstitution

Eine Inkubation bei Temperaturen zwischen 30°C und 40°C ist unabdingbare Voraussetzung für die erfolgreiche Totalrekonstitution zu aktiven 30S Untereinheiten (Traub & Nomura, 1968). Die Poly (Phe)

Synthese-Reaktion aber läuft in der Versuchsanordnung nach Nierhaus et al. (1973) bei 30°C für 45 Min ab. Da es ein Ziel dieser Arbeit ist, den ersten Schritt der 3oS Rekonstitution zu untersuchen, ist es ratsam, bei den anschließenden Reaktionen (z.B. Poly (Phe) Synthese) alles zu vermeiden, was den ersten Rekonstitutionsschritt ermöglicht. Problematisch ist hier die Inkubation des Poly (Phe) Systems, die - wie oben gezeigt - die Rekonstitution suboptimal ermöglicht. Im folgenden Versuch wird nach einer Inkubationstemperatur für die Poly (Phe) Synthese gesucht, bei der der erste Rekonstitutionsschritt nicht ablaufen kann.

In Tabelle 8a wird die Rekonstitution im Poly (Phe) System gemessen. Zunächst wurde 16S RNA unter Rekonstitutionsbedingungen 20 Min bei 40°C inkubiert. Anschließend wurden bei 0°C 3,0c HAc - und SP3,0 Proteine sowie die zur Poly (Phe) Synthese notwendigen Reagentien dazugegeben. Die Reaktion der Poly (Phe) Synthese fand bei fünf verschiedenen Temperaturen zwischen 20°C und 33°C für 60 Min statt. Dann wurde das synthetisierte Polyphe-nylalanin gemessen.

In Tabelle 8b findet die Rekonstitution zum 3,0c Partikel im Rekonstitutionssystem statt, die Rekonstitution zu 3oS Untereinheiten jedoch im Poly (Phe) System. Die Poly (Phe) Synthese-Reaktion fand bei den gleichen Temperaturen statt wie bei 8a.

Tabelle 8

Der Einfluß der Inkubationstemperatur während der Poly (Phe) Synthese auf die Aktivität der dort rekonstituierten Partikel im Vergleich zu der Aktivität von Partikeln, die im Rekonstitutionssystem und im Poly (Phe) System rekonstituiert worden sind

Rekonstitution im Rekonstitutionssystem für 20 Min bei 40°C		Rekonstitution im Poly (Phe) System	Inkubationstemperatur	cpm	%
a	16S RNA + -	3,0c HAC + SP3,0 Proteine	60 Min/20°C	2013	4
	" -	" "	" /23°C	3986	9
	" -	" "	" /27°C	9808	21
	" -	" "	" /30°C	19416	42
	" -	" "	" /33°C	29464	64
b	16S RNA + 3,0c HAC Proteine	SP3,0 Proteine	60 Min/20°C	18028	39
	" "	" "	" /23°C	25572	55
	" "	" "	" /27°C	35002	76
	" "	" "	" /30°C	39913	87
	" "	" "	" /33°C	43168	94
Leerwert 30°C				1605	3
30S Untereinheiten				46167	100

Die Inkubation von 16S RNA und TP30 im Poly (Phe) System führt zu praktisch inaktiven Partikeln, wenn die Poly (Phe) Synthese bei 20°C stattfindet. Wenn unter Standardbedingungen des Poly (Phe) Systems (30°C) inkubiert wird, steigt die Aktivität auf 42% (siehe Tabelle 8a).

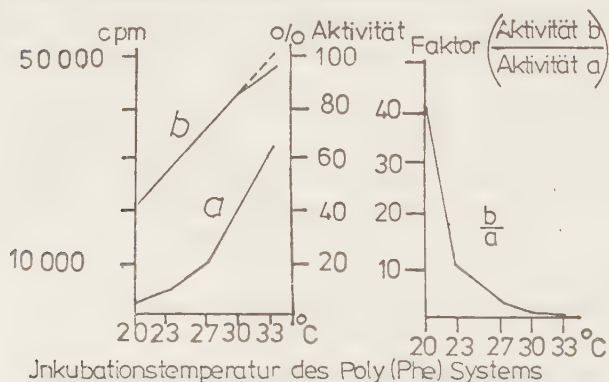
Wenn nur die Rekonstitution von 3,0c Partikeln zu 30S Untereinheiten im Poly (Phe) System stattfindet, weil 3,0c Partikel bereits im Rekonstitutionssystem entstanden sind (siehe Tabelle 8b), zeigen sich bei 20°C Inkubationstemperatur des Poly

(Phe) Systems 40% Aktivität und bei 30°C 87%. Bei noch höherer Inkubationstemperatur werden 100% Aktivität gemessen.

Wenn man die Aktivitäten rekonstituierter Partikel miteinander vergleicht (siehe Abbildung 5), wird ersichtlich, daß die Aktivitäten von den Tabelle 8b zugrundeliegenden Experimenten mit steigender Temperatur linear zunehmen, während die von Tabelle 8a in Abhängigkeit von der Temperatur nicht linear steigen.

Abbildung 5

Vergleich der Aktivitäten von gemäß Tabelle 8a rekonstituierten Partikeln mit denen, die gemäß Tabelle 8b rekonstituiert worden sind



Vergleicht man die Aktivitäten von Tabelle 8b mit denen von 8a bei jeder Temperatur, so stellt sich heraus, daß der Wert bei 20°C in Tabelle 8b neunmal höhere Aktivität hat als der entsprechende in Tabelle 8a. Bei 30°C zeigt Tabelle 8b nur noch doppelt höhere Aktivität als Tabelle 8a. Zieht man die Leerwertaktivität jeweils ab, wird der Unter-

schied bei 20°C noch größer (40 fach höhere Aktivität), bei 30°C bleibt es bei der doppelten Aktivität (Abbildung 5).

Unter Verzicht auf maximal mögliche Aktivität erhält man bei 20°C Inkubationstemperatur bei der Poly (Phe) Synthese ein kombiniertes in vitro Rekonstitutions-Poly (Phe) Synthese-System. Darin ist die Rekonstitution von 3,0c-Partikeln zu aktiven 3oS Untereinheiten uneingeschränkt möglich, die Rekonstitution von 16S RNA und TP3o zu 3oS Untereinheiten jedoch unmöglich. 40% Aktivität ist das Maximum dessen, was die Poly (Phe) Synthese bei 20°C zu liefern vermag, verglichen mit der Aktivität nativer 3oS Untereinheiten bei 30°C. Dieser Wert ist hinreichend hoch. Andererseits ist er bis zu 40 mal höher als die Aktivität der totalen Rekonstitution im Poly (Phe) System (dabei ist der Leerwert abgezogen) bei 20°C.

Aus diesen Gründen eignet sich das kombinierte System hervorragend zum Studium der Vorgänge in der ersten in vitro Rekonstitutionsstufe der 3oS Untereinheiten. Es ist sowohl einfacher als auch Material und Zeit sparender als das System von Held & Nomura (1973), das eine zusätzliche Rekonstitution und eine Zentrifugation beinhaltet. In den folgenden Experimenten wird die Poly (Phe) Synthese bei 20°C durchgeführt.

3.8. Die Identifizierung derjenigen in der 3,0c-Proteinfraktion enthaltenen Proteine, die für die temperaturabhängige Konformationsänderung $RI_{30} \rightarrow RI_{30}^*$ notwendig sind

Abbildung 4 demonstriert, daß ein vollkommen unterschiedlicher Proteinbesatz im Gradientenprofil gleiche, signifikante Konformationsveränderung verursacht. Es soll im folgenden untersucht werden,

welche Proteinkomposition für die Schaffung der biologisch relevanten Konformation RI* notwendig und hinreichend ist. Es ist denkbar, daß nicht alle neun 3,0c-Proteine dazu notwendig sind, sondern nur einige.

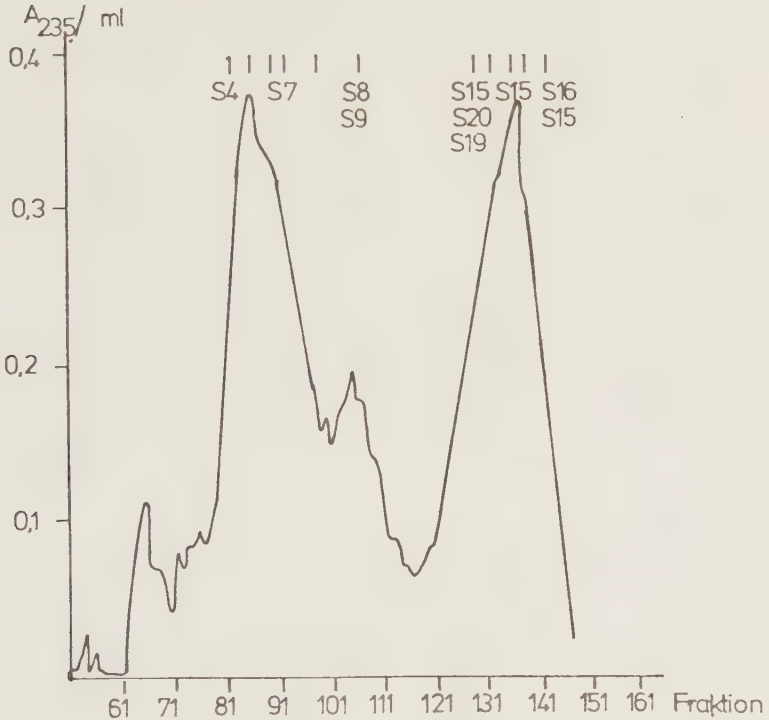
Ein sinnvolles Meßsystem für das Zustandekommen von RI₃₀* Partikeln ist das kombinierte Rekonstitutions-Poly (Phe) Synthese-System (vergleiche Abschnitt 3.7). Dieses System erlaubt den ersten in vitro Rekonstitutionsschritt zum RI₃₀* Partikel nur im Rekonstitutionsansatz, während der zweite Schritt RI₃₀* → 3oS im modifizierten Poly (Phe) System möglich ist. Die Aktivität der Poly (Phe) Synthese ist direkt korrelierbar zur Ausbeute der RI₃₀* Bildung im Rekonstitutionsansatz.

Anfangs ergaben Rekonstitutionsversuche mit Proteinen, die nach Hindennach et al. (1971) isoliert worden waren, keine Partikel, die in der Poly (Phe) Synthese aktiv waren. Deswegen wurde versucht, RNA freie 3,0c Proteine mit einer G100 Säule voneinander zu trennen.

Aus 20 000 A₂₆₀ 3oS Untereinheiten wurden 3,5c-Proteine hergestellt. Diese Proteine wurden in einer G100 Säule in TM4 - 6M Harnstoff Puffer nach ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht getrennt. Durch die Messung der Extinktion bei 235 nm konnte festgestellt werden, welche Fraktionen proteinhaltig waren (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6

Elutionsprofil einer G100 Säule, die mit 3,5c Proteinen beschickt wurde



Auftrag: 3,5c-Partikel aus 20000 A_{260} 3oS; 1 Fraktion = 100Gtt $\hat{=}$ 5 ml

Nach der Einengung des Volumens der Fraktionen und ihrer Dialyse gegen TM4-Puffer wurden die Fraktionen mit den höchsten A_{235} Werten einer Protein 1-D Elektrophorese unterworfen. So konnte festgestellt werden, daß Fraktion 81 nur S4, Fraktion 91 nur S7 und Fraktion 133 nur S15 enthielt, während in Fraktion 84 Protein S4 mit S5 und etwas S7, in Frak-

tion 88 S7 mit etwas S4, in den Fraktionen 104 bis 106 S8 mit S9, in den Fraktionen 127 - 130 S15 mit S19 und/oder S20 sowie in den Fraktionen 137 - 141 S15 mit S16 vermischt war (siehe Abbildung 6).

Um zu untersuchen, ob die 3,5c Proteine nach der Säulentrennung zur Rekonstitution mit 16S RNA und Poly (Phe) Synthese in der Lage sind, wurden die Fraktionen 84 (S4/S5/(S7)), 88 (S7/(S4)), 106 (S8/S9), 127 (S15/S19/S20) und 140 (S16/(S15)) in das kombinierte Rekonstitutions-Poly (Phe) System eingesetzt. Es wurden bewußt die Fraktionen, die die schlechteste Proteintrennung aufweisen, eingesetzt, weil in ihnen alle Proteine des 3,5c Partikels enthalten waren. Aus Gründen der Materialersparnis wurde auf eine Optimierung verzichtet. Dagegen wurde die Extinktion von 20 µl jeder Fraktion in 1000 µl H₂O bei 230 nm gemessen. Betrug dieser Wert 0,1 A₂₃₀, so wurden 5 µl der Fraktion in jede Rekonstitution gegeben.

Wenn die Fraktion 140 mit S16 und etwas S15 oder die Fraktion 84 mit S4/S5/(S7) ausgelassen wurde, sank zwar die Poly (Phe) Syntheseaktivität, doch ist sie mit 33% bzw. 25% noch relativ hoch (siehe Tabelle 9). Da S5 nur in Fraktion 84 und S16 nur in Fraktion 140 vorkommen, können diese Proteine keinen entscheidenden Anteil an der Bildung von RI₃₀^{*} haben.

Dieser Befund wird durch den nächsten Versuch (siehe Tabelle 10) bestätigt, welcher zeigt, daß einige Proteine verwendet werden konnten, die nach Hindennach et al. (1971) isoliert worden waren. Die nach dieser Methode isolierten Proteine sind weniger verunreinigt als die mittels G100 Säulen gewonnenen.

Tabelle 9

Die Aktivität der G100 Fraktionen im kombinierten Rekonstitutions-Poly (Phe) Synthesystem

16S RNA	S4/ S5/ S7	S7/ (S4)	S8/ S9	S15/ S19/ S20	S16/ S15	In- ku- ba- ti- ons- temp.	Rekonst. zu 30S mit TP30	cpm	%
-	-	-	-	-	-	20 Min/40°C	593	1	
+	+	+	+	+	+	↓	28384	44	
+	-	+	+	+	+		16385	25	
+	+	-	+	+	+		8139	13	
+	+	+	-	+	+		3841	6	
+	+	+	+	-	+		9505	15	
+	+	+	+	+	-		21211	33	
+	TP30				20 Min/0°C		1356	2	
+	"				20 Min/40°C		62270	96	
-	30S Untereinheiten				20 Min/40°C		65024	100	

Tabelle 10

Nachweis dafür, daß die Formierung von RI* Partikeln nicht ohne die Proteine S4, S7, S8 und S15 möglich ist

16S RNA	S4	S7	S8/9	S8	S15	S13	S9	S18	S20	Inkuba- tionstemper.	cpm	%
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20 Min/40°C	942	2
+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	"	16901	39
+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	"	17013	39
+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	"	18865	43
+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	"	4875	11
+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	"	19024	43
+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	"	5190	12
+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	"	1056	2
+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	"	2459	6
+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	"	5235	12
+			TP30							20 Min/0°C	2151	5
+			TP30							20 Min/40°C	26546	61
-			3oS Untereinheiten							20 Min/0°C	43913	100
-			3oS "							20 Min/40°C	43726	

Symbole: + = vorhanden; - = nicht vorhanden; = nach Hindennach et al. isoliert; = durch die G100 Säule getrennt; die Rekonstitutionen aus 16S RNA und isolierten Proteinen zu RI* Partikeln erhielten durch Zugabe von TP30 in das Poly (Phe) System die Möglichkeit, sich zu 3oS Untereinheiten zu formieren.

Es ist nötig, die nach Hindennach et al. (1971) isolierten Proteine mittels Dialyse gegen harnstoffhaltigen Puffer zu aktivieren: Nach der Volumeneinengung durch Lyophilisation werden sie in 0,8 ml TM4-Puffer gelöst, 90 Min gegen TM4-6M Harnstoff Puffer und dreimal 45 Min gegen TM4-Puffer dialysiert. Die zur Rekonstitution notwendige Menge wird durch die Extinktion bei 230 nm bestimmt.

Nach Tabelle 10 schaffen allein die Proteine S4, S7, S8 und S15, wenn sie mit 16S RNA rekonstituiert werden, die aktive Konformation RI₃₀* in zufriedenstellendem Ausmaß (43% Aktivität). Die Zugabe von S9 oder S20 stimuliert nicht (43% bzw. 39% Aktivität).

Die Wirkung des Fehlens von einem der vier wichtigen Proteine auf die Aktivität wurde in einem anschließenden Versuch in Beziehung gesetzt zum Rekonstitutionserfolg von verschiedenen Proteingemischen mit 16S RNA (Tabelle 11).

Tabelle 11

Die Beeinträchtigung der Aktivität durch das Fehlen eines Proteins

16S RNA	S4	S7	S8	S15	Inkubations- temperatur	Rekonstitu- tion im Poly(Phe)Sys- tem mit	cpm	%
-	-	-	-	-	20 Min/40°C	TP30	940	2
+	+	+	+	+	"	"	22420	50
+	-	+	+	+	"	"	2991	7
+	+	-	+	+	"	"	3915	9
+	+	+	-	+	"	"	703	2
+	+	+	+	-	"	"	978	2
+			TP30		20 Min/ 0°C	-	551	1
-			TP30		20 Min/40°C	-	1096	3
+			TP30		20 Min/40°C	-	45911	104
+	3,0c		HAc-Prot.		20 Min/ 0°C	SP3,0-Prot.	700	2
+	3,0c		HAc-Prot.		20 Min/40°C	SP3,0-Prot.	11651	26
+	3,0c		HAc-Prot.		20 Min/ 0°C	TP30	1182	3
+	3,0c		HAc-Prot.		20 Min/40°C	TP30	35164	79
-	3,0c		-Partikel		20 Min/ 0°C	TP30	2702	6
-	3,0c		-Partikel		20 Min/40°C	TP30	54091	122
-	30S		Unterein- heiten		20 Min/40°C	-	44377	100

Symbole siehe Tabelle 10

Das Fehlen der Proteine S8 oder S15 hemmt die Aktivität vollständig. Wenn S4 oder S7 fehlt, bleibt interessanterweise eine Restaktivität bestehen (7% bzw. 9 - 12%, Tabellen 10 und 11).

3.9. Weitere Experimente mit dem rekonstituierten Minimal-core-Partikel aus den vier Proteinen S4, S7, S8 und S15 sowie 16S RNA

Bislang wurde die Poly (Phe) Synthese bei einer ungesättigten Phenylalaninkonzentration gemessen. Dies Verfahren gestattet auch Messungen geringerer Aktivität. Es muß daher festgestellt werden, wie sich eine gesättigte Polyphenylalaninkonzentration auf die Aktivität rekonstituierter Minimal-core-Partikel auswirkt (Tabelle 12).

Tabelle 12

Vergleich der Syntheseleistung von R1₃₀* Partikeln bei gesättigtem und ungesättigtem Phenylalanin-Angebot

16S RNA	S4	S7	S8	S15	Inkubation		cpm	%	
+	-	+	+	+	20 Min/40°C	TP30	1244	4	A
+	+	+	+	+	"	TP30	17613	51	
+	3,0c HAc Prot.				"	TP30	23396	67	
+	TP30				"	-	30075	85	
-	30S Unterein.				"	-	34797	100	
+	-	-	-	-	20 Min/40°C	TP30	367	3	B
+	+	+	+	+	"	TP30	3183	29	
+	3,0c HAc Prot.				"	TP30	6577	59	
+	TP30				"	-	8215	73	
-	30S Unterein.				"	-	11187	100	

Symbole siehe Tabelle 10; A = ungesättigte, B = gesättigte Phenylalaninkonzentration

Beide Male haben die Minimal-core-Partikel signifikante Aktivität: unter gesättigten Phenylalaninkonzentrationen 30%, unter ungesättigten 50%.

Im nächsten Experiment wurde die RI_{30}^* Bildung {16S + S8, S15, S4, S7} verglichen mit den Kombinationen {16S + S8, S15, S4} sowie {16S + S8, S15, S7} (siehe Tabelle 13 und Abbildung 7).

Zunächst wurde der Einfluß der Rekonstitutionszeit untersucht.

Tabelle 13

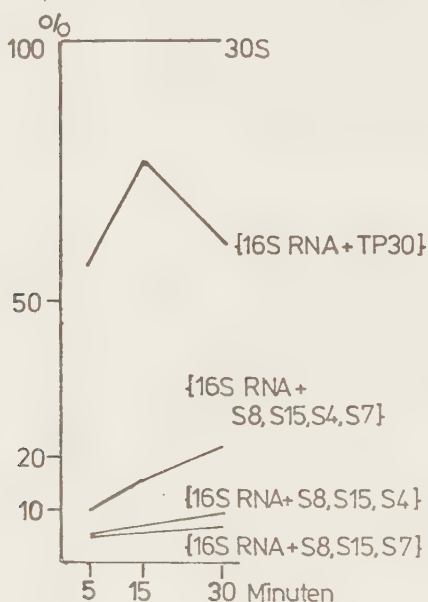
Kinetik vollständiger und unvollständiger Minimal-core-Partikel

16S RNA	S8	S15	S7	S4	Inkubation		cpm	%
-	-	-	-	-	30 Min/40°C	TP30	680	2
+	+	-	+	-	5 Min/40°C	TP30	2031	6
+	+	-	+	-	15 "	"	2559	7
+	+	-	+	-	30 "	"	3847	10
+	+	+	-	-	5 "	"	1901	5
+	+	+	-	-	15 "	"	1989	5
+	+	+	-	-	30 "	"	2506	7
+	+	+	+	+	5 "	"	3631	10
+	+	+	+	+	15 "	"	5763	16
+	+	+	+	+	30 "	"	8225	22
+	TP30				5 "	-	20934	58
+	TP30				15 "	-	28039	77
+	TP30				30 "	-	23406	63
-	30S Unterein.				5 "	-	36286	100
-	30S	"			15 "	-	36498	
-	30S	"			30 "	-	37389	

Symbole siehe Tabelle 10

Abbildung 7

Rekonstitutionskinetik verschiedener Partikel bei 40°C



Als Ergebnis der Kinetik stellt sich heraus, daß während eines Sechstels der Inkubationszeit bereits 50% der maximalen Aktivität erbracht wird. Das Fehlen von S4 hemmt die maximale Aktivität etwas stärker als das Fehlen von S7. Ein Plateau wird außer bei 30S Untereinheiten nicht erreicht. Dafür ist nicht eine Degradation der 16S RNA verantwortlich zu machen. Diese ist nach 60 Min/40°C ebenso intakt wie nach 5 Min/40°C bzw. 0°C (Ergebnis einer RNA 1-D Elektrophorese).

Die Rekonstitutionskombination mit vier Proteinen ist aktiver als die mit 3 Proteinen. Letztere ist zu gering als daß sich weitergehende Experimente durchführen ließen.

Experimente, in denen die Pipettierreihenfolge, die Inkubationstemperatur und die Mg^{++} Konzentration während des Rekonstitutionsschrittes variiert wurden, führten nicht zu erhöhter Aktivität im modifizierten Poly (Phe) System. Daraus folgt, daß die Bedingungen des Rekonstitutionssystems nicht nur für die RI³⁰*Rekonstitution, sondern auch für die Rekonstitution des Minimal-core-Partikels, bestehend aus 16S RNA und den Proteinen S4, S7, S8 sowie S15, optimal sind.

3.10. Eine Methode, durch die auf einfache Weise eine große Anzahl gleichartiger Sucrosegradienten gleichzeitig hergestellt werden kann:
Der kryogenetische Gradient

Einige Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten nur mit Hilfe von Sucrosegradientenzentrifugation gewonnen werden. Dabei gewann ich die Erkenntnis, daß diese Technik in zweierlei Hinsicht verbesserungswürdig ist. Zum einen ist es unverhältnismäßig zeitaufwendig, jeden Gradienten einzeln zu machen. Wenn immer die gleichen Sucrosegradienten benötigt werden, ist es sinnvoll, nach einer Methode zu suchen, mit der viele Gradienten gleichzeitig hergestellt werden können. Zum anderen hängt die Reproduzierbarkeit bei der herkömmlichen Gradientenanfertigung von der Geschicklichkeit des Experimentators ab. Es ist wünschenswert, diese Variabilität auszumerzen.

Beide Veränderungen lassen sich durch einen einfachen Vorgang herbeiführen. Es reicht aus, eine homogene Sucroslösung in ein Zentrifugenröhrchen zu füllen und langsam einzufrieren. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur ist ein Sucrosegradient entstanden.

Der gradientenbildende Effekt des Einfrierens von Sucroslösungen ist schon bei Baxton-Gabbard (1972) in einem umständlichen Verfahren - dreimaliges Gefrieren und Auftauen - beschrieben worden. Wir haben diesen Effekt systematisch untersucht und zu einem einfachen Verfahren entwickelt.

Die Entstehung des kryogenetischen Gradienten läßt sich verfolgen, wenn man den Einfrierprozeß nach verschiedenen Zeiten unterbricht (siehe Abbildung 8). Dabei erreicht die Sucrosekonzentration des Gradienten eine maximale Spannweite, wenn die Sucroslösung vollständig gefroren ist (bei -8°C beispielsweise nach 24 Std). Längeres Einfrieren verursacht keine weitere Veränderung des Gradienten, so daß er in gefrorenem Zustand über Wochen stabil bleibt.

Die Zeit, in der ein kryogenetischer Gradient entsteht, hängt von der Temperatur ab, bei der die Entstehung abgewartet wird (siehe Abbildung 9). Beim Schockgefrieren (-86°C , hervorgerufen durch Aceton und Trockeneis) ist die Zeit kurz und die Spannweite des kryogenetischen Gradienten klein. Bei -4° bis -20°C dauert der Einfrierungsprozeß lange, und es kann sich eine große Spannweite der Sucrosekonzentration ausbilden.

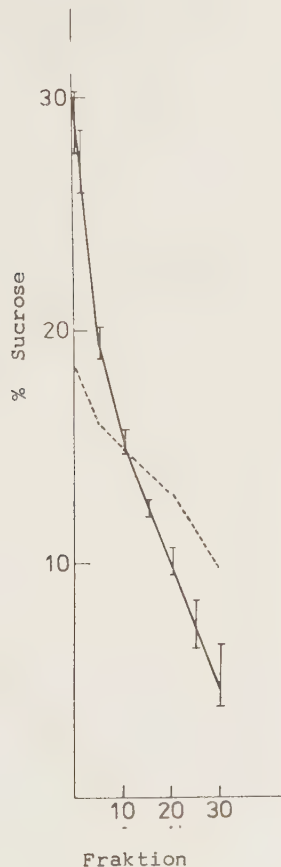
Abbildung 8

Kinetik der Ausformung
eines kryogenetischen
Gradienten aus 30%
TM4-Sucroslösung bei
-8°C



Abbildung 9

Die Ausformung eines
kryogenetischen Gra-
dienten in Abhängig-
keit von der Gefrier-
temperatur von 15%
H₂O Sucrose bei -20°C
(—) und -40°C (---)



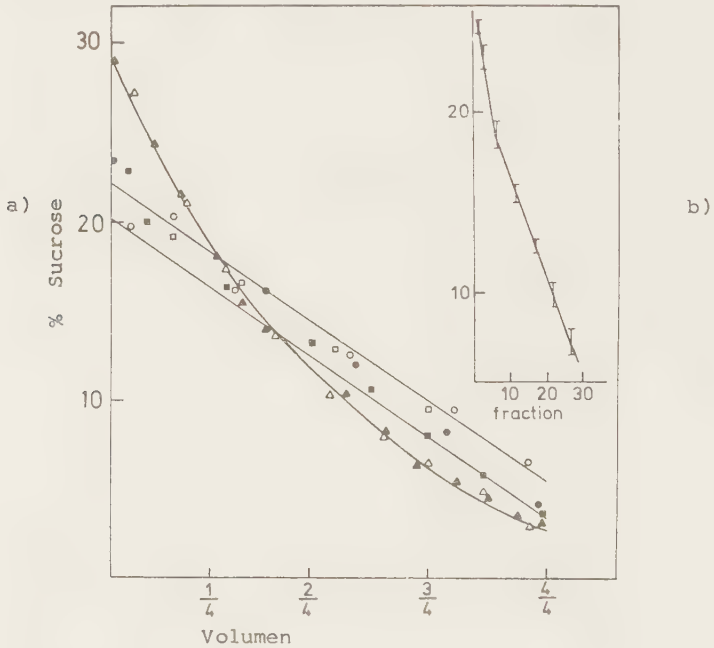
Die angewandte Meßmethode erbrachte keine Unterschiede in der Spannweite, wenn bei -20°C bzw. -8°C eingefroren wurde. Ebenso unerheblich ist es, welche Temperatur über 0°C die Sucroslösung vor dem Einfrieren hatte.

Abbildung 10

Der Einfluß des Volumens auf die Gestalt des kryo-genetischen Gradienten aus 15% H_2O Sucrose:

a) bei unterschiedlichem Volumen

b) bei gleichem Volumen in unterschiedlicher Form



○ = SW60 ● = SW40 ▲ = SW27
□ = SW65 ■ = SW27.1 △ = SW25.2

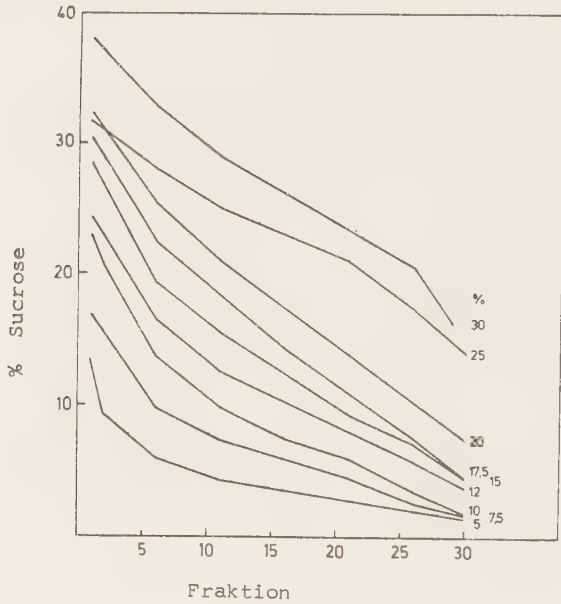
Form und Spannweite von kryogenetischen Gradienten sind des weiteren vom Volumen abhängig (siehe Abbildung 10a). Volumina bis 15 ml (Röhrchen für SW Rotoren 60, 65, 40 und 27.1) verursachen mehr oder weniger lineare Gradienten, größere Volumina (Röhrchen für SW Rotoren 27 und 25.2) jedoch nicht lineare Gradienten.

Dabei ist es unerheblich, welche Form das Volumen füllt. In Abbildung 10b kommt zum Ausdruck, daß das gleiche Volumen (etwa 13 ml) jeweils den gleichen kryogenetischen Gradienten verursacht, obwohl dieser sich einmal in einem SW40 Röhrchen (Füllhöhe 8,5cm; Durchmesser 1,4 cm), einmal in einem 50 Ti Röhrchen (Füllhöhe 6,6 cm; Durchmesser 1,6 cm) und einmal in einem 30 ml Sorvall-Röhrchen (Füllhöhe 2,7 cm; Durchmesser 2,6 cm) geformt hat.

In erster Linie ist die Spannweite kryogenetischer Gradienten natürlich abhängig von der Sucrosekonzentration der Lösung, aus der sie entstehen (Abbildung 11).

Abbildung 11a

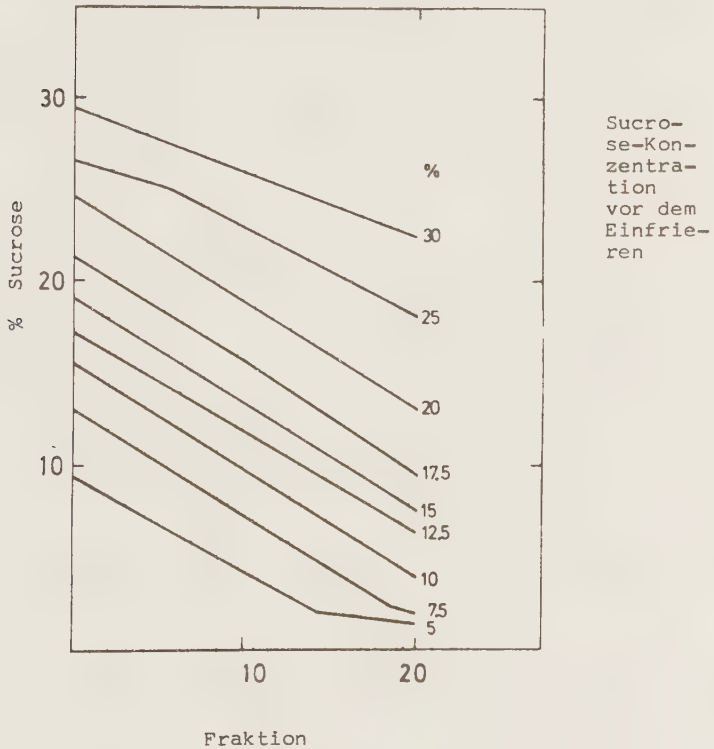
Eichkurve für SW40 Röhrchen, welche zeigt, aus welchen homogenen Sucroslösungen (H₂O) bei -20°C sich die dargestellten kryogenetischen Gradienten gebildet haben



Sucro-
se-Kon-
zentra-
tion
vor dem
Einfrie-
ren

Abbildung 11b

Eichkurve für SW60 Röhrchen, welche zeigt, aus welchen homogenen Sucroslösungen (H_2O) bei $-20^{\circ}C$ sich die dargestellten kryogenetischen Gradienten gebildet haben



Der Grund für die Ausbildung von Gradienten durch das Einfrieren von Sucroslösungen liegt im Unterschied der Gefrierpunkte von reinem Wasser und wässrigen Lösungen. Bei letzteren gefrieren die Partien mit dem höchsten Wasseranteil zuerst und

treiben als Eis an die Oberfläche. Im verbliebenen Volumen ist dadurch die Konzentration der gelösten Substanz erhöht. Bei anhaltender Gefrier-temperatur gefrieren sukzessive Partien mit immer höherer Konzentration gelöster Substanz und schichten sich unter das zuerst gebildete Eis. Zuletzt gefriert auch der unterste Volumenteil mit der höchsten Konzentration der gelösten Substanz. Der Auftauprozess ist die Umkehrung des Gefrierprozesses: zuerst taut der Teil mit der höchsten Konzentration gelöster Substanz, zuletzt der mit der geringsten.

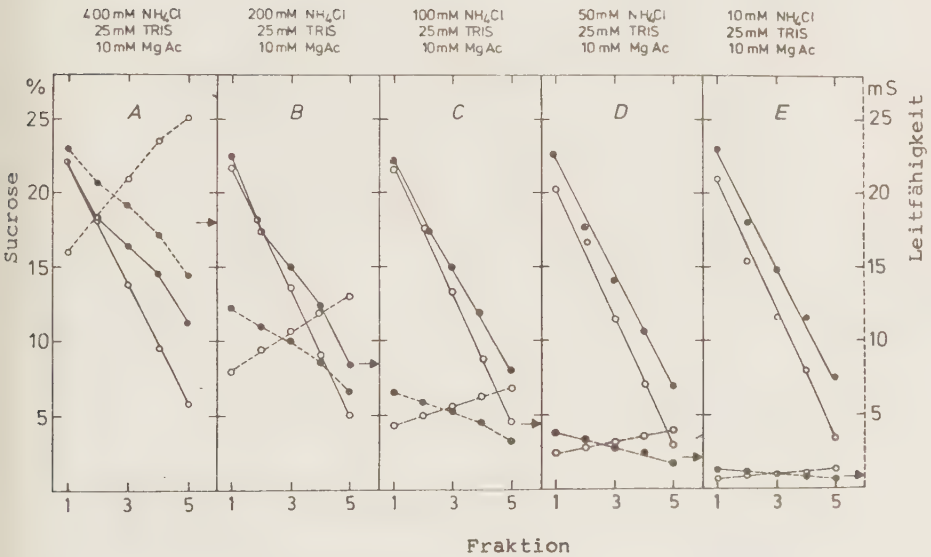
Ionen haben die gleiche, den Gefrierpunkt erniedrigende Wirkung auf Wasser wie Sucrose. Der kryogenetische Gradient weist neben dem Sucrosegradienten daher auch einen Ionengradienten auf, wenn er aus einem sucrosehaltigen Puffer entsteht. Der Ionengradient kann durch die Unterschiede in der Leitfähigkeit der Fraktionen gemessen werden. Abbildung 12 zeigt, daß der Leitfähigkeitsgradient eines jeden kryogenetischen Gradienten gleichläufig mit seinem Sucrosegradienten ist.

Bei den herkömmlichen, von Hand gemischten isotonischen Gradienten geht der Leitfähigkeitsgradient auf den vorhandenen Sucrosegradienten zurück, da ansteigende Sucrosekonzentrationen die Leitfähigkeit einer Lösung mit konstanter Ionenkonzentration erniedrigen.

In Abbildung 12 A und B ist außerdem zu sehen, daß eine hohe Ionenkonzentration die Form der Gefriergradienten beeinflusst.

Abbildung 12

Vergleich der Leitfähigkeit von kryogenetischen Gradienten aus 15% Sucrose (20 Std/-20°C) und isoionischen Gradienten aus 0 - 30% Sucrose bei verschiedenen Ionenstärken



- = Sucrosekonzentration der kryogenetischen Gradienten in %
- = Sucrosekonzentration der isoionischen Gradienten in %
- -●- - = Leitfähigkeit der kryogenetischen Gradienten in mS
- -○- - = Leitfähigkeit der isoionischen Gradienten in mS
- = Leitfähigkeit der Sucroslösungen vor dem Gefrierprozeß

Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob die Ionen-
gradienten der kryogenetischen Gradienten von
Abbildung 12 die biologische Aktivität von Ribo-
somen beeinflussen, wurden ribosomale Unterein-
heiten in verschiedenen kryogenetischen Gradien-
ten sedimentiert. Isolierte 3oS- bzw. 5oS Unter-
einheiten wurden durch einen kryogenetischen Gra-
dienten aus 15% Rek Sucrose (das entspricht Ab-
bildung 12 A) zentrifugiert. Im Parallelversuch
entstand der kryogenetische Gradient aus 15% TM4
Sucrose (mit einem Ionengradienten, der schwächer
als in Abbildung 12 E war). Zur Kontrollzentrifu-
gation diente ein isoionischer Gradient aus 0-30%
TM4 Sucrose. Die sedimentierten ribosomalen Unter-
einheiten wurden resuspendiert. Je 1 A₂₆₀ wurde
im Poly (Phe) System auf Aktivität untersucht
(siehe Tabelle 14).

Tabelle 14

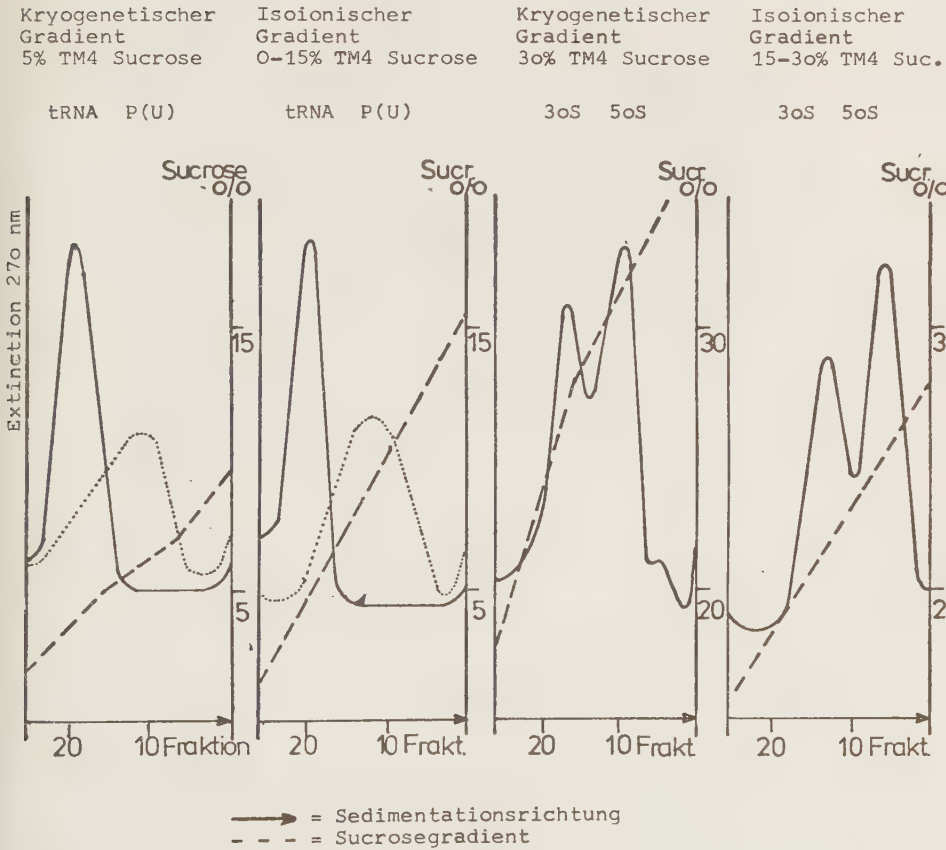
Vergleich der Poly (Phe) Syntheseaktivität ribo-
somalier Untereinheiten nach der Zentrifugation
im kryogenetischen bzw. isoionischen Gradienten

						cpm	%
3oS im kryogen. Grad. aus	15% Rek	Sucrose	+ 5oS			49755	74
5oS " " " "	"	"	+ 3oS			46620	70
3oS " " " "	15% TM4	Sucrose	+ 5oS			46320	69
5oS " " " "	"	"	+ 3oS			51475	77
3oS im isoion. Grad. aus	0-30% TM4	Sucr.	+ 5oS			64175	96
5oS " " " "	"	"	+ 3oS			55605	83
						3oS + -	4060
						- + 5oS	1820
						3oS + 5oS	66901
							100

Die cpm-Werte wurden durch Doppelbestimmungen ermittelt

Abbildung 13

Vergleich der Trennung von Partikeln durch Zentrifugation im kryogenetischen Gradienten mit der im isoionischen Gradienten



Die ribosomalen Untereinheiten vertragen den Wechsel der Ionenstärke im Ionengradienten des kryogenetischen Gradienten befriedigend, denn es können mindestens 69% Aktivität in der Poly (Phe) Synthese gemessen werden. Der stärkere Ionengradient des kryogenetischen Gradienten aus 15% Rek Sucrose beeinträchtigt dabei die Aktivität der ribosomalen Untereinheiten nicht stärker als der schwächere Ionengradient des kryogenetischen Gradienten aus 15% TM4 Sucrose.

Die Trennung ribosomaler Untereinheiten bzw. tRNA und Polyuridylsäure voneinander kann durch kryogenetische Gradienten ebenso gut erreicht werden wie durch isoionische Gradienten (siehe Abbildung 13).

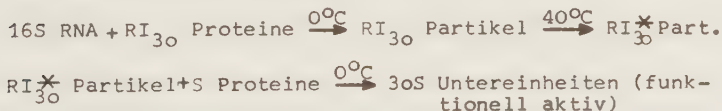
4. Diskussion

4.1. Die Funktionsäquivalenz der 3,0c-Partikel mit den RI_{30}^* Partikeln

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß 3,0c-Partikel bei $0^{\circ}C$ in zwei Konformationen vorkommen (siehe Abbildung 1) und daß nach Temperaturaktivierung des 3,0c-Partikels eine von ihm (3MIII) weit- aus überwiegt. Diese Konformation ist in der Lage, sich bei $0^{\circ}C$ mit TP30 zu voll bei der Poly (Phe) Synthese aktiven 3oS Untereinheiten zu formieren (Tabelle 11). Die Rekonstitution von 3,0c-Partikeln mit TP30 zu 3oS Untereinheiten entspricht damit einem späten Schritt der in vitro Rekonstitution der 3oS Untereinheiten, nämlich der Komplettierung der RI_{30}^* Partikel in der Kälte mit Proteinen zu 3oS Untereinheiten (Traub & Nomura, 1969; siehe Abbildung 14).

Abbildung 14

Schema für die Rekonstitution von 3oS Untereinheiten nach Traub & Nomura, 1969



Hingegen weicht die Entstehung von 3,0c-Partikeln stark von dem in Abbildung 14 gezeigten Weg der Bildung von RI_{30}^* Partikeln ab. Während diese aus 16S RNA und RI_{30} Proteinen rekonstituiert werden müssen, entstehen 3,0c-Partikel direkt aus nativen

3oS Untereinheiten durch die Einwirkung von 3 M LiCl.
Die Gewinnung von 3,0c-Partikeln ist damit wesentlich einfacher als die Darstellung der äquivalenten RI₃₀* Partikel.

Tabelle 15

Vergleich des Proteinbesatzes verschiedener Partikel

	RI ₃₀ * Proteine		in vitro 21S		in vivo 21S		3,0c-Partikel aus 3oS		Bindung an 16S RNA
	a	b	c	d	e	f	g	h	i
S4	++	++	++	++	+	+	++	++	++
S7	++	++	++	-	+	+	++	++	++
S8	++	++	++	++	++	+	++	++	++
S16	++	-	++	++	+	+	+	++	+
S19	++	-	+	-	+	-	+	+	+
S15	+	++	++	++	++	+	++	+	++
S17	+	-	++	++	+	+	+	+	+
S5	+/-	-	+	++	-	+	-	-	
S9	+/-	-	++)	+/-	+/-	-	-	+/-	
S11	+/-	-	-	-	-	-	-	-	
S12	+/-	-	-	-	-	-	-	-	
S18	+/-	-	++	+	+/-	-	-	-	
S6	-	-	++	++	+	-	+	+/-	
S13	-	-	++	++	+	+	+/-	+	++
S20	-	-	++	+	+	+	-	++	++
S1	-	-	-	+	-	-	-	-	
S2	-	-	-	+/-	-	-	-	-	
S3	-	-	-	-	-	-	-	-	
S10	-	-	-	-	-	-	-	-	
S14	-	-	-	-	-	-	-	-	
S21	-	-	-	+	-	-	-	-	

a = Held & Nomura, 1973; b = Ergebnis der vorliegenden Arbeit, Tabelle 10; c = Traub & Nomura, 1969; d = Homann & Nierhaus, 1971; e = Nashimoto et al., 1971; f = Nierhaus et al., 1973; g = Schreiner & Nierhaus, 1973 (Zentrifugation); h = Marquardt, 1973 (Äthanol-fällung); ++ = stark vorhanden,

+ = schwächer vorhanden, +/- = in Spuren vorhanden, - = nicht nachweisbar mit der 2-D Elektrophorese,) = in der 2-D Elektrophorese nicht getrennt; i = spezifische Bindung nachgewiesen: für S4 und S8 Schaup et al., 1971; für S13, S17 und S20 Mizushima & Nomura, 1970; für S7 und S15 Zimmermann et al., 1972; für S16 und S19 die vorliegende Arbeit, Abbildung 3; ++ = von anderen Arbeitsgruppen bestätigt, + = in einem Labor nachgewiesen.

Die Proteine, die mit 16S RNA bei 0°C RI₃₀ Partikel bilden, sind identifiziert worden (Traub & Nomura, 1969; Homann & Nierhaus, 1971) und können daher mit dem Proteinbesatz der 3,0c-Partikel verglichen werden (Tabelle 15). Das 3,0c-Partikel enthält weniger Proteine (11) als die RI₃₀ Partikel (13 bzw. 14). Neun Proteine sind den Partikeln gemeinsam. Trotz des geringeren Proteinbesatzes sind die 3,0c-Partikel den RI₃₀ Partikeln gleichwertig, denn beide können temperaturaktiviert werden, wodurch sie in die Lage versetzt werden, bei 0°C die noch fehlenden Proteine anlagern zu können und so aktive 30S Untereinheiten zu bilden. Die funktionelle Übereinstimmung muß daher auf die Komponenten zurückzuführen sein, die beide Partikel gemeinsam aufweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob die übereinstimmenden Proteine alle notwendig und hinreichend sind für die Bildung von RI₃₀^{*} Partikeln. Zu diesem Zweck mußte eine Methode entwickelt werden, die es gestattet, die Bildung von RI₃₀^{*} Partikeln auf einfache Weise zu messen. Ausgangspunkt war die Beobachtung, daß unter den

Standardbedingungen des Poly (Phe) Systems bereits eine Totalrekonstitution von 30S Untereinheiten erfolgt, wobei 30% der Aktivität von nativen 30S Untereinheiten gemessen wurde (siehe Tabelle 5). Es wurde deshalb versucht, das Poly (Phe) System derart zu modifizieren, daß die Bildung aktiver 30S Untereinheiten aus RI_{30}^* Partikeln durch die Zugabe von TP30 ungestört erfolgen kann, während die gleichzeitige Bildung von RI_{30}^* Partikeln aus 16S RNA und TP30 möglichst vollständig unterdrückt wird.

Mit diesem System sollte es möglich sein, die während eines vorgeschalteten Rekonstitutionsschrittes gebildeten RI_{30}^* Partikel im Poly (Phe) System zu aktiven 30S Untereinheiten zu vervollständigen. Die im Poly (Phe) System meßbare Syntheseaktivität wäre dadurch eine direkte Folge der im vorgeschalteten System vollzogenen Rekonstitution von RI_{30}^* Partikeln. Diese Anforderungen erfüllte das Poly (Phe) System nach einer Veränderung des Ionenmilieus auf 250 mM NH_4^+ und 25 mM Mg^{++} sowie nach der Senkung der Inkubationstemperatur von 30°C auf 20°C. Diese Veränderungen machten das System außerordentlich sensitiv: Die Zugabe von TP30 zu 16S RNA bewirkte nun keinerlei Aktivität, wogegen temperaturaktivierte 3,0c-Partikel nach TP30-Zugabe volle Aktivität zeigten (siehe Tabelle 11). Mit diesem System bereitete die Identifizierung derjenigen Proteine, die im vorgeschalteten System für die Rekonstitution von RI_{30}^* Partikeln notwendig waren, keine Schwierigkeiten. Die Analyse konnte sich dabei auf die elf im 3,0c-Partikel vorhandenen Proteine beschränken. Zunächst wurden die durch Essigsäure extrahierten Proteine des 3,0c-Partikels einer Gelfiltration

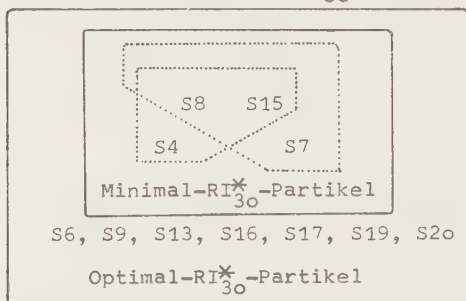
(Sephader G100) unterworfen. Dadurch erhielten wir die Proteine S4, S7 und S15 rein, jedoch waren die anderen Proteine in wechselndem Ausmaß miteinander kontaminiert (siehe Abbildung 6). Daneben wurde versucht, Proteine, die nach Standardmethoden isoliert worden sind (Hindennach et al., 1971), durch Behandlung mit Harnstoff (siehe Seite 16) für unser System verwendbar zu machen. Das ist uns bei den Proteinen S4, S7 und S8 gelungen (siehe Tabelle 10). Auf diese Weise verfügten wir über hochgereinigte Proteine, mit denen eine detaillierte Untersuchung der für die Bildung von RI_{30}^* Partikeln notwendigen Proteine möglich war. Als Ergebnis der Untersuchungen erweist sich lediglich eine kleine Gruppe von Proteinen innerhalb der 3,0c-Proteine als notwendig für die Bildung von RI_{30}^* Partikeln, nämlich S4, S7, S8 und S15 (zusammen mit 16S RNA).

Die gleiche Methodik erlaubt eine Differenzierung innerhalb dieser Gruppe von Proteinen (siehe Tabelle 11). Es konnte gezeigt werden, daß die Proteine S8 und S15 zwar notwendig, aber nicht hinreichend sind für die Bildung von RI_{30}^* Partikeln. Erst, wenn entweder S4 oder S7 hinzugefügt werden, entstehen signifikante Mengen von RI_{30}^* -Partikeln. Wenn alle vier Proteine mit 16S RNA zusammengebracht werden, erreicht die Ausbeute an RI_{30}^* -Partikeln (Minimal-Partikel, Abbildung 15) die Hälfte des Werts, den der optimale Proteinsatz von elf Proteinen (3,0c-Proteine) mit 16S RNA verursacht (Optimal-Partikel, Abbildung 15). Innerhalb der 3,0c-Proteine kann daher folgende Reihenfolge der Wichtigkeit für die RI_{30}^* -Partikel-Formierung aufgestellt werden: 1) S8 und S15, 2) S4 und/oder S7, 3) alle übrigen Proteine des 3,0c-Partikels,

denn sie haben einen optimierenden Effekt. Diese Reihenfolge ist in Abbildung 15 wiedergegeben.

Abbildung 15

Die Reihenfolge der Wichtigkeit von 3oS Proteinen für die Formierung von RI_{30}^* -Partikeln

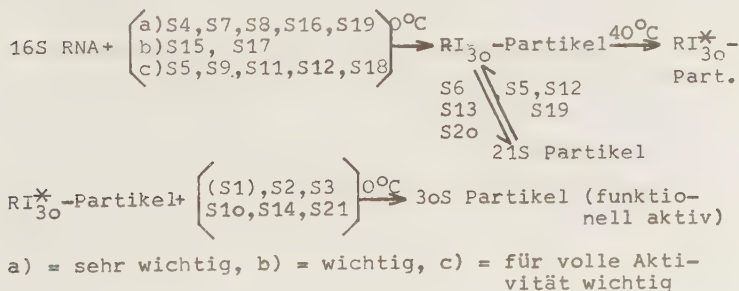


In einem Kontrollexperiment wurde untersucht, ob die 3,0c-Proteine notwendigerweise die 1. Rekonstitutionsstufe bilden müssen oder ob in einem weiteren, noch unbekannten Rekonstitutionsprozeß die komplementären SP3,0-Proteine ganz oder teilweise die in vitro Bildung der kleinen ribosomalen Untereinheit beginnen und in einem zweiten Schritt die noch fehlenden Proteine zu aktiven 3oS Untereinheiten aufnehmen können. Zu diesem Zweck wurden während einer 1. Inkubation SP3,0-Proteine mit 16S RNA inkubiert und die entstandenen Partikel durch Zentrifugation isoliert. Während einer 2. Inkubation wurden 3,0c-Proteine zugegeben, das neuerliche Produkt abermals durch Zentrifugation isoliert (Tabelle 2 a, No 6). Die Untersuchung im Poly(Phe)System ergab lediglich 10% Aktivität. Sie muß damit erklärt werden, daß in jeder Präparation von Split-Proteinen geringe Mengen von Core-Proteinen nachweisbar sind (Ta-

belle 2 b). Die SP3,O-Proteine sind also nicht in der Lage, die erste Rekonstitutionsstufe oder ein RI_{30}^* ähnliches Partikel zu bilden. Die Ergebnisse, die mit unserer Methodik erzielt werden konnten, präzisieren die bisherige Vorstellung von der in vitro Rekonstitution von RI_{30}^* -Partikeln erheblich. Diese Vorstellung geht im wesentlichen auf die Ergebnisse von Held & Nomura (1973) zurück. Sie wird in Abbildung 16 zusammengefaßt. Verglichen mit unseren Ergebnissen zeigt sich Übereinstimmung darin, daß die Proteine S4, S7, S8 und S15 wichtig für die Bildung von RI_{30}^* -Partikeln sind. Darüber hinaus sind im System von Held & Nomura die Proteine S16, S17 und S19 als notwendig, die Proteine S5, S9, S11, S12 und S18 als optimal bestimmt worden (100% Aktivität). In unserem System werden die Proteine S16, S17, S19, S9 und S13 sowie S20 lediglich benötigt, wenn 100% Aktivität in der Poly (Phe) Synthese erreicht werden sollen. Der Vergleich der Proteinzusammensetzung, die in den beiden Systemen für volle Aktivität benötigt wird, zeigt zusätzliche Übereinstimmung in Bezug auf die Proteine S9, S16, S17 und S19.

Abbildung 16

Zusammenfassung der Analyse von Held & Nomura bezüglich der Proteine, die für die Formierung von RI_{30}^* -Partikeln benötigt werden.



Held & Nomura (1973) bemerkten, daß auch dann funktionell aktive Partikel entstehen können, wenn die Proteine S16 und S17 nicht in dem Versuch vorhanden waren. Wir schließen daraus, daß im Einklang mit unseren Experimenten diese Proteine nicht zu den essentiellen, RI_{30}^* -Partikel bildenden Proteinen gehören. Das steht im Gegensatz zu den Schlußfolgerungen von Held & Nomura (1973, siehe Abbildung 16). Die von ihnen als in weiterem Sinne wichtig bezeichneten Proteine S5, S11, S12 und S18 sind in unserer, 100% Aktivität verursachenden Proteingruppe nicht vorhanden und können daher keine Bedeutung für die Bildung von RI_{30}^* -Partikeln haben. Die Proteine S6, S13 und S20 wurden mit beiden Systemen als unwichtig ermittelt. Bezüglich Protein S15 widersprechen sich die Befunde aus beiden Systemen insofern, als bei uns S15 unerläßlich ist für die Bildung von RI_{30}^* -Partikeln, im System von Held & Nomura aber nur eine Wichtigkeit 2. Ordnung festgestellt wird. An anderer Stelle (Held et al., 1974) zeigte diese Arbeitsgruppe jedoch, daß das gereinigte Protein S15 an 16S RNA binden kann und daß dieser RNA-Proteinkomplex direkt zur Rekonstitution von 30S Untereinheiten benutzt werden kann, wenn TP30 unter Rekonstitutionsbedingungen beigegeben werden. Die bloße Möglichkeit, daß S15 die Reihenfolge der in vitro Rekonstitution eröffnen kann, bedeutet zwar noch keine Notwendigkeit - denn es könnte Alternativreihenfolgen geben - doch ist die Übereinstimmung mit unserem S15 betreffenden Befund nicht zu übersehen : Auch bei uns wird S15 als eins der ersten Proteine eingebaut.

Die offensichtlichen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen von Held & Nomura (1973) und unseren Ergebnissen lassen sich mindestens teilweise durch die erheblich geringere Empfindlichkeit des Held & Nomura Systems erklären. Dieses besteht nämlich aus drei aufeinanderfolgenden Inkubationen: In der ersten (30 Min/40°C) soll die Bildung der RI_{30}^* -Partikel und in der zweiten (10 Min/30°C) deren Vervollständigung zu aktiven 30S Untereinheiten erfolgen. In der dritten (10 Min/30°C) wird schließlich die Poly (Phe) Synthese gemessen.

Die Zeit der zweiten und dritten Inkubation ist auf je 10 Min verkürzt worden, um die Formierung von RI_{30}^* -Partikeln hier möglichst zu unterdrücken. Das gelingt jedoch nur zum Teil. Wenn nämlich 16S RNA und TP30 während der ersten Inkubation bei 0°C belassen werden, wodurch die Rekonstitution von RI_{30}^* -Partikeln verhindert werden sollte, zeigen sich dennoch 10% Aktivität im Poly (Phe) System. Daher muß eine während der ersten Inkubation stattfindende Bildung von RI_{30}^* -Partikeln mehr als 10% Aktivität im Poly (Phe) System hervorrufen, um überhaupt entdeckt zu werden. Außerdem verursacht die optimale Rekonstitution von RI_{30}^* -Partikeln während der ersten Inkubation lediglich eine Aktivitätssteigerung um das 10 bis 15 fache der nicht unterdrückbaren Systemaktivität. In unserem System bringt das entsprechende Experiment eine Aktivitätssteigerung um das 30 bis 100 fache. Die größere Sensitivität unseres Systems wird bedeutsam, wenn die für die Bildung von RI_{30}^* -Partikeln als wichtig erkannten Proteine in der ersten Inkubation bei 40°C eingesetzt werden: Im Held & Nomura System werden 40% Aktivi-

tät gemessen (Proteingruppen A und B, siehe Tabelle 16) und damit das vier bis sechsfache der nicht unterdrückbaren Systemaktivität. In unserem System werden 50% Aktivität gemessen (mit den Proteinen S4, S7, S8 und S15, siehe Tabellen 11 und 16), wobei die Aktivität 10 bis 20 mal höher als der Leerwert ist.

Der größere Spielraum unseres Systems erlaubte eine weitergehende Analyse, deren Ergebnis die Differenzierung zwischen unbedingt notwendigen (S8 und S15) sowie alternativ notwendigen (S4 beziehungsweise S7) Proteinen ist (siehe Abbildung 15).

Tabelle 16

Vergleich der Leistung des in dieser Arbeit vorgestellten Systems (Tabelle 11) mit der des Systems von Held & Nomura (1973)

		1. Inkubation		2. und 3. Ink.	% Aktiv.
		30 Min/0°C	-	je 10 Min/30°C	
Held & Nomura	1. 16S RNA+A+B+C+D+E	" /40°C	-	"	12
	2. 16S RNA+A+B+C+D+E	" /0°C	+D+E	"	100
	3. 16S RNA+A+B+C	" /40°C	+D+E	"	7
	4. 16S RNA+A+B+C	" /40°C	+C+D+E	"	100
	5. 16S RNA+A+B	" /40°C		"	41
Tabelle 11		1. Inkub.		2. Inkubation	
	1. 16S RNA+TP30	20 Min/0°C	-	60 Min/20°C	1
	2. 16S RNA+TP30	" /40°C	-	"	104
	3. 16S RNA+3,1c-Prot.	" /0°C	+TP30	"	3
	4. 16S RNA+3,1c-Prot.	" /40°C	+TP30	"	80
	5. 16S RNA+S4,S7,S8,S15	" /40°C	+TP30	"	50

A bis E sind Proteingemische: A enthält S7,S8,S16; B enthält S11, S15, S18, S19; C enthält S5, S9, S12, S17, S20; D enthält S2, S6, S10; E enthält S1, S3, S13, S14, S21

4.2. Die biologische Bedeutung der Hierarchie der Proteinanlagerung während der Rekonstitution von RI_{30}^* -Partikeln

Die unterschiedliche Wichtigkeit der Proteine S4, S7, S8 und S15 für eine erfolgreiche Formierung von RI_{30}^* -Partikeln spiegelt möglicherweise eine Reihenfolge der Proteinanlagerung während der in vitro Rekonstitution wieder. Ein Vergleich mit der Biosynthese von 30S Untereinheiten drängt sich auf. Für diesen Prozeß ist eine zweistufige Reihenfolge der Proteinanlagerung nachgewiesen worden (Nashimoto et al., 1971; Nierhaus et al., 1973; siehe Tabelle 15).

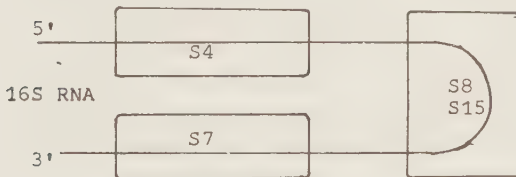
Die von Nashimoto et al. untersuchten Partikel stammten aus einer kältesensitiven Mutante von *E. coli*, die bei der kritischen, niedrigen Temperatur gezogen wurde. Deswegen konnten nur RI_{30} -Partikel entstehen (die sich wegen der zu niedrigen Temperatur nicht in RI_{30}^* -Partikel umwandeln konnten) und außerdem sehr wahrscheinlich auch halbfertige oder gerade erst begonnene RI_{30} -Partikel-Vorstufen. Diese wurden nicht von den akkumulierten RI_{30} -Partikeln getrennt und daher mitgeerntet und mituntersucht. Es muß also erwartet werden, daß diejenigen Proteine, die die Synthese von RI_{30} -Partikeln aus RNA und Proteinen beginnen, bei der Analyse der an RNA gebundenen Proteine überproportional stark nachweisbar sind. Das trifft auf die Proteine S15 und S8 zu (siehe Tabelle 15). Der in vivo Befund von Nashimoto et al. unterstützt daher unseren in Bezug auf die Proteine S8 und S15 gleichartigen Befund der in vitro Rekonstitution.

Das 21S Partikel von Nierhaus et al. enthält nur neun Proteine (siehe Tabelle 15) und schränkt daher die Proteine ein, die für die RI_{30} -Partikel Bildung in Frage kommen. Allerdings fehlt dort Protein S7. Dieses Protein spielt jedoch in der in vitro Rekonstitution eine große Rolle. Die vier Proteine S4, S7, S8 und S15 erfüllen alle eine wichtige Forderung des in vitro Rekonstitutionsschemas (siehe Abbildung 14): Sie können bei $0^{\circ}C$ spezifisch an 16S RNA binden. Tabelle 4 zeigt das für S7 und S15. Andernorts wurde das für S8 (Schulte & Garrett, 1972) beziehungsweise S4 (Folkhard et al., 1975) bewiesen. Ferner ist bekannt, an welcher Stelle des 16S RNA Moleküls diese vier Proteine binden: S4 in der Molekülhälfte, die das 5' Ende enthält (Schaup et al., 1971), S8 und S15 in der mittleren Region (Schaup et al., 1970; Zimmermann et al., 1972). Die Zuordnung von S7 zu einer bestimmten Region der 16S RNA gelang mittels Verdauungsexperimenten, denn S7 erscheint als einziges Protein an einem Fragment der 16S RNA, welches das 3' Ende des Moleküls enthält (Zimmermann et al., 1972). Gestützt auf diese Befunde ist die folgende Vorstellung vom Beginn der in vitro Rekonstitution von RI_{30}^* -Partikel erlaubt: Bei $0^{\circ}C$ besetzen die vier Proteine S4, S7, S8 und S15 die Mitte sowie Partien aus beiden Hälften der 16S RNA und bilden dadurch das RI_{30} -Partikel. Inkubation bei $40^{\circ}C$ wandelt das RI_{30} -Partikel in das RI_{30}^* -Partikel um, wodurch den übrigen 30S Proteinen die Möglichkeit der Anlagerung gegeben wird. Da S15 und S8 notwendig sind, um das biologisch relevante RI_{30}^* -Partikel zu bilden, beide Proteine

aber an die Mitte der 16S RNA binden, muß gefolgert werden, daß die Mitte ein strategisch wichtiger Punkt für die Ausbildung von RI_{30}^* -Partikeln ist.

Abbildung 17

Die Verteilung der Proteine des Minimal- RI_{30}^* -Partikels auf der 16S RNA



Die längliche Form der Proteine wurde wegen der Ergebnisse der Immun-Elektronenmikroskopie (Tischendorf et al., 1975) gewählt.

Neben den vier Proteinen, die bei der Bildung von RI_{30}^* -Partikeln eine entscheidende Rolle spielen, besitzen auch andere Proteine der 30S Untereinheit die Fähigkeit, an 16S RNA zu binden (siehe Tabelle 15). In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis durch zwei verschiedene Methoden (SW40 Zentrifugation und 1-D Elektrophorese) erbracht, daß zusätzlich zu den bereits bekannten Proteinen auch S16 und S19 diese Eigenschaft besitzen (siehe die Abbildungen 2 und 4 e). Für Protein S16 wird die Fähigkeit zur Interaktion mit 16S RNA allerdings bestritten (Held et al., 1974).

Unter den von uns gewählten Bedingungen (siehe die Tabellen 3 und 4) können sowohl S16 und S19 als auch alle bereits bekannten Bindungsproteine

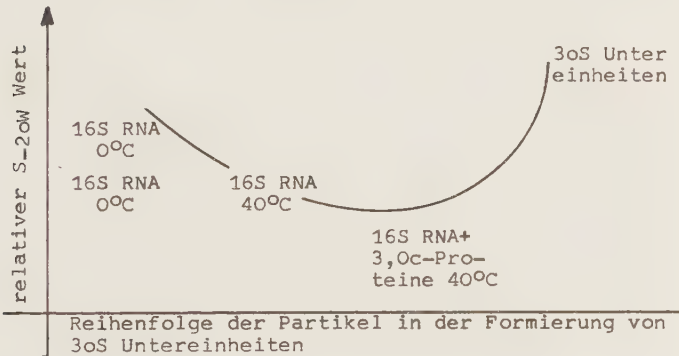
spezifisch an 16S RNA binden. Entscheidend für die Spezifität der Bindung war die Konzentration von Mg^{++} (4 mM) beziehungsweise NH_4^+ (150 mM). Alle diese Proteine bilden den Proteinbesatz des 3,0c-Partikels (siehe Tabelle 15), welches durch Inkubation bei 40°C und Zusatz von SP3,0 in ein 100% aktives RI_{30}^* -Partikel umgewandelt wird. Möglicherweise ist die Eigenschaft der 3,0c-Proteine, an 16S RNA zu binden, eine Voraussetzung für die Rekonstitution voll aktiver RI_{30}^* -Partikel. Das schließt aber weder aus, daß auch andere Proteine an 16S RNA binden können, noch soll das heißen, daß die RNA-Protein-Interaktion im 3,0c-Partikel die einzige Qualität der 3,0c-Proteine ist. Protein S7 konnte durch bivalente Reagentien mit S9, S13 oder S19, die Proteine S4 und S20 mit S16 verknüpft werden (Green & Kurland, 1973). Bei der Rekonstitution von 30S Untereinheiten wurde bemerkt, daß Protein S7 die Voraussetzung für den Einbau von S9 und S19, Protein S8 für S16 ist (Mizushima & Nomura, 1970). Diese Befunde legen eine Annahme von Protein-Protein-Interaktion nahe. Beide Interaktionsarten der über den Minimalsatz (S4, S7, S8, S15) hinausgehenden 3,0c-Proteine scheinen eine stabilisierende Rolle zu spielen, wodurch die volle Aktivität bei Anwesenheit aller 3,0c-Proteine im RI_{30}^* -Partikel erklärt werden könnte.

Sowohl die spezifische, RI_{30}^* -Partikel verursachende als auch die sonst durch Proteinbindung bei 40°C auftretende Konformationsänderung manifestiert sich in einem S_{20w} Wert, der geringer ist als der der von deproteinisierter 16S RNA bei 40°C. Dieser ist wiederum geringer als der der

schweren Konformation von 16S RNA bei 0°C (siehe die Abbildungen 1 c und d, sowie 3 c). Am Ende der Rekonstitution jedoch ist die 30S Untereinheit, die im Sucrosegradienten deutlich schneller wandert als jede der 16S RNA Konformationen. Die S_{20w} Werte der Partikel, die während der Rekonstitution von 30S Untereinheiten nacheinander auftreten, durchlaufen daher ein Minimum. Das ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt.

Abbildung 18

Die Veränderung des S_{20w} Wertes während der Formierung von 16S RNA und Proteinen zu 30S Untereinheiten



Die temperaturabhängige Konformationsänderung RI nach RI* läßt sich im Sucrosegradienten verfolgen. Interessanterweise führt jedes der 3,0c-Proteine zu einer Konformationsänderung, wenn es einzeln mit 16S RNA bei 40°C inkubiert wird, nicht aber bei 0°C , obwohl auch dann eine Bindung der Proteine an 16S RNA mit der 1-D Elektrophorese festgestellt werden kann.

Nach diesem Befund liegt der Schluß nahe, daß allein die 16S RNA die Fähigkeit zur Konformationsänderung besitzt und daß diese neue Konformation von den Proteinen lediglich stabilisiert wird. Unsere Analyse der Rekonstitution von RI_{30}^* -Partikeln widerlegt diese wohl zu einfache Interpretation. Die Bildung von RI_{30}^* -Partikeln benötigt vier bestimmte Proteine, während die im Sucrosegradienten beobachtete Konformationsänderung unabhängig davon auftritt, welche Proteine der 16S RNA bei 40°C angeboten werden (siehe Abbildung 4 b, c, e). Die biologische Relevanz liegt also nicht in der Konformationsänderung schlechthin, sondern in der spezifisch von den Proteinen S4, S7, S8 und S15 und 16S RNA verursachten.

4.3. Anhang

Bei der Beschäftigung mit den verschiedenen Möglichkeiten der Sucrosegradientenzentrifugation stießen wir auf eine Methode, die - ausgehend von einer homogenen Sucroslösung - das Entstehen eines Gradienten durch Einfrieren und Auftauen beschreibt (kryogenetischer Gradient; Baxton-Gabbard, 1972). Die dort angegebene Methode besteht in einem umständlichen, dreifachen Einfrier- und Auftauprozeß.

In der vorliegenden Arbeit wurden die verschiedenen Parameter der Methode analysiert und wir konnten zeigen, daß ein einmaliges Einfrieren bei Temperaturen nicht unter -20°C sowie ein langsames Auftauen bei Raumtemperatur (etwa 20°C) ausreicht, um einen vorzüglich reproduzierbaren Gradienten zu erhalten. Neben dem langsamen Einfrieren und Auftauen wird die Bildung des Gradienten von der

Konzentration der Ausgangssucrose und ihrer Ionenstärke beeinflusst sowie dem Volumen, in dem sich der Gradient etabliert. Weitgehend unabhängig ist das Gradientenprofil jedoch von der Form des Röhrchens, in dem der Gradient entsteht. Neben einem Sucrosegradienten entsteht auch ein Ionengradient nach den gleichen Regeln der Gefrierpunktserniedrigung. Wir fanden, daß mit ansteigender Sucrosekonzentration auch die Konzentration der Ionen zunimmt - ein bedeutsamer Umstand, der in der Veröffentlichung von Baxton-Gabbard (1972) keine Erwähnung findet. Dieser Ionengradient kann von Vorteil sein, wenn ionenstabile und ionenlabile Komplexe mit ähnlichem S_{20W} Wert getrennt werden sollen. Die Anwendung von kryogenetischen Gradienten zur Bestimmung von S_{20W} Werten ist jedoch dann nicht empfehlenswert, wenn der S_{20W} Wert eines Partikels durch die Ionenkonzentration beeinflussbar ist.

Der kryogenetische Gradient eignet sich vorzüglich zur Gewinnung analytischer Mengen von aktiven ribosomalen Untereinheiten sowie zur Trennung und Isolierung ribosomaler Fragmente und Dimere. Wegen seiner einfachen Herstellung, die praktisch keinen Aufwand erfordert, und seiner hervorragenden Reproduzierbarkeit gehört er zu den Routinemethoden unseres Labors.

Literaturliste:

- Baxter-Gabbard, K.L.: FEBS Letters 20, 117-119 (1972),
"A simple method for the large-scale preparation
of sucrose gradients"
- Ceri, H. & P.Y. Maeba: Biochem. Biophys. Acta 312,
337-348 (1973), "Association of a ribonuclease
with the 5oS ribosomal subunit of Escherichia
coli MRE 600"
- Expert-Bezançon, A., M.-F. Guérin, D.H. Hayes, L.
Legault & J. Thibault: Biochimie 56, 77-89 (1974),
"Preparation of E. coli ribosomal subunits with-
out loss of biological activity"
- Folkhard, W., J. Pilz, O. Kratky, R. Garrett & G.
Stöffler: Eur.J.Biochem. 59, 63-71 (1975), "Small-
-angle X-ray studies on the structure of 16S ri-
bosomal RNA and of a complex of ribosomal protein
S4 and 16S ribosomal RNA from Escherichia coli"
- Garrett, R.A., K.H. Rak, L. Daya & G. Stöffler:
Molec.Gen.Genet. 114, 112-124 (1972), "Ribosomal
proteins XXIX. Specific protein binding sites on
16S RNA of Escherichia coli"
- Gesteland, R.F.: J.Mol.Biol. 16, 67-84 (1966),
"Isolation and characterization of ribonuclease
I mutants of Escherichia coli"
- Green, M. & C.G. Kurland: Mol.Biol.Reports 1, 105
(1973), "Molecular interactions of ribosomal
components IV. Cooperative interactions during
assembly in vitro"
- Hardy, S.J.S., C.G. Kurland, P. Voynow & G. Mora:
Biochemistry 8, 2897-2905 (1969), "The ribosomal
proteins of Escherichia coli I. Purification
of the 3oS ribosomal proteins"

- Held, W.A., B. Ballou, S. Mizushima & M. Nomura: J.Biol.Chem. 249, 3103-3111 (1974), "Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from Escherichia coli. Further studies"
- Held, W.A. & M. Nomura: Biochemistry 12, 3273-3281 (1973), "Rate-determining step in the reconstitution of Escherichia coli 30S ribosomal subunits"
- Hindennach, I., G. Stöffler & H.G. Wittmann: Eur. J.Biochem. 23, 7-11 (1971), "Ribosomal proteins: Isolation of the proteins from 30S ribosomal subunits of Escherichia coli"
- Homann, H.E. & K.H. Nierhaus: Eur.J.Biochem. 20, 249-257 (1971), "Ribosomal proteins: Protein composition of biosynthetic precursors and artificial subparticles from ribosomal subunits in Escherichia coli K12"
- Kaltschmidt, E. & H.G. Wittmann: Proc.Nat.Acad. Sci.USA 67, 1276-1282 (1970 a), "Ribosomal proteins XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of Escherichia coli as determined by two-dimensional gel electrophoresis"
- Kaltschmidt, E. & H.G. Wittmann: Analyt.Biochem. 36, 401-412 (1970 b), "Ribosomal proteins VII. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis for fingerprinting of ribosomal proteins"
- Kurland, C.G.: J.Mol.Biol. 2, 83-91 (1960), "Molecular characterization of ribonucleic acid from Escherichia coli ribosomes I. Isolation and molecular weights"
- Loenig, U.E.: Biochem.J. 102, 251-257 (1967), "The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis"
- Marquardt, O.: Diplomarbeit FUB (1973), "Analyse eines RNA-Protein-Komplexes aus der ribosomalen 30S Untereinheit von Escherichia coli"

- Mizushima, S. & M. Nomura: Nature 226, 1214-1218 (1970), "Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*"
- Muto, A., C. Ehresmann, P. Fellner & R.A. Zimmermann: J.Mol.Biol. 86, 411-432 (1974), "RNA-protein interactions in the ribosome I. Characterization and ribonuclease digestion of 16S RNA-ribosomal protein complexes"
- Nashimoto, H., W.A. Held, E. Kaltschmidt & M Nomura: J.Mol.Biol. 62, 121-138 (1971), "Structure and function of bacterial ribosomes XII. Accumulation of 21S particles by some cold-sensitive mutants of *Escherichia coli*"
- Nierhaus, K.H., K. Bordasch & H.E. Homann: J.Mol. Biol. 74, 587-597 (1973), "Ribosomal proteins XLIII. In vitro assembly of *Escherichia coli* ribosomal proteins"
- Nierhaus, K.H. & F. Dohme: Proc.Nat.Acad.Sci.USA 71, 4713-4717 (1974), "Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*"
- Nierhaus, K.H. & V. Montejo: Proc.Nat.Acad.Sci.USA 70, 1931-1935 (1973), "A protein involved in the peptidyltransferase activity of *Escherichia coli* ribosomes"
- Peacock, A.C. & W.C. Dingman: Biochemistry 6, 1818-1826 (1967), "Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide-gel electrophoresis"
- Peacock, A.C. & W.C. Dingman: Biochemistry 7, 659-668 (1968), "Analytical studies on nuclear ribonucleic acid using polyacrylamide-gel electrophoresis"

- Rosset, R. & R. Monier: Biochem.Biophys.Acta 68, 653-656 (1963), "A propos de la présence d'adide ribonucléique de faible poids moléculaire dans les ribosomes d'E.coli"
- Roth, H.E. & K.H. Nierhaus: J.Mol.Biol. 94, 111-121 (1975), "Structural and functional studies of ribonucleoprotein fragments isolated from Escherichia coli 5oS ribosomal subunits"
- Schaup, H.W., M. Green & C.G. Kurland: Molec.Gen. Genet. 109, 193-205 (1970), "Molecular interactions of ribosomal components I. Identification of RNA binding sites for individual 3oS ribosomes"
- Schaup, H.W., M. Green & C.G. Kurland: Molec.Gen. Genet. 112, 1-8 (1971), "Molecular interactions of ribosomal components II. Site-specific complex formation between 3oS proteins and ribosomal RNA"
- Schreiner, G. & K.H. Nierhaus: J.Mol.Biol. 81, 71-82 (1973), "Protein involved in the binding of dihydrostreptomycin to ribosomes of Escherichia coli"
- Schulte, C. & R.A. Garrett: Molec.Gen.Genet. 119, 345-355 (1972), "Optimal conditions for the interaction of ribosomal protein S8 and 16S RNA and studies on the reaction mechanism"
- Stanley, W.M. & R.M. Bock: Biochemistry 4, 1302-1311 (1965), "Isolation and physical properties of the ribosomal ribonucleic acid of Escherichia coli"
- Tischendorf, G., G. Stöffler & H.G. Wittmann: Molec. Gen.Genet. Manuskript in Vorbereitung, "Structural homology between two proteins of 3oS and 5oS ribosomal subunits from Escherichia coli as determined by immunochemical methods"

- Tischendorf, G., H. Zeichhard & G. Stöffler: Proc. Nat.Acad.Sci.USA 72, 4820-4824 (1975), "Architecture of the Escherichia coli ribosome as determined by immune electron microscopy"
- Traub, P. & M. Nomura: Proc.Nat.Acad.Sci.USA 59, 777-784 (1968), "Structure and function of E. coli ribosomes V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins"
- Traub, P. & M. Nomura: J.Mol.Biol. 40, 391-413 (1969), " Structure and function of E. coli ribosomes VI. Mechanism of assembly of 30S ribosomes studied in vitro"
- Voynow, P. & C.G. Kurland: Biochemistry 10, 517-524 (1971), "Stoichiometry of the 30S ribosomal proteins of Escherichia coli"
- Zimmermann, R.A., A. Muto, P. Fellner, C. Ehresmann & C. Branlant: Proc.Nat.Acad.Sci.USA 69, 1282-1286 (1972), "Location of ribosomal protein binding sites on 16S ribosomal RNA"

Lebenslauf:

Ich wurde am 28.Mai 1946 in Vikkammer in Norwegen geboren. Ostern 1951 wurde ich in Göttingen eingeschult. Im Herbst 1966 bestand ich das Abitur. Die nächsten zwei Jahre verbrachte ich bei der Bundeswehr. Seit dem Wintersemester 1968 studierte ich Biologie: zunächst in Göttingen (Georg-August Universität), seit dem bestandenen Vordiplom (1970) in Berlin (Freie Universität). Zum Jahresende 1973 bestand ich die Diplomprüfung am Fachbereich 23 der Freien Universität. Seither arbeitete ich an meiner Dissertation am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem.

difo-druck · 8600 bamberg
untere königstraße 30